

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**NUEVOS USOS TERAPÉUTICOS DE  
CILASTATINA EN NEFROPROTECCIÓN**

Sonia Camaño Páez

Madrid, 2008

**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**



## **NUEVOS USOS TERAPÉUTICOS DE CILASTATINA EN NEFROPROTECCIÓN**

Memoria presentada por D<sup>a</sup> Sonia Camaño Páez, licenciada en Bioquímica y en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor, bajo la codirección del Dr. Alberto Tejedor Jorge y el Dr. Alberto Lázaro Fernández, realizada en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" de Madrid.

Madrid, 2008



Don Alberto Tejedor Jorge, Doctor en Medicina y

Don Alberto Lázaro Fernández, Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y  
Biomedicina,

#### CERTIFICAN

Que Doña Sonia Camaño Páez, Licenciada en Bioquímica y Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “*Nuevos usos terapéuticos de cilastatina en nefroprotección*”, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 15 de Diciembre de 2008.

Directores

Vº Bº del Tutor

Fdo. Dr. Alberto Tejedor Jorge.

Fdo. Dr. Rafael Garesse Alarcón.

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular.  
Universidad Autónoma de Madrid.

Fdo. Dr. Alberto Lázaro Fernández.

**Caer está permitido. ¡Levantarse es obligatorio!.**

Proverbio Ruso

**Podemos lograr todo lo que deseemos si lo intentamos lo suficiente.**

H. Keller

**El éxito es conseguir lo que se desea.  
La felicidad es apreciar lo que ya se ha conseguido.**

F. Berbis

A mi hermana,  
ejemplo de fortaleza y espíritu luchador

## **AGRADECIMIENTOS**

Creo que el principio de los agradecimientos de esta tesis no va a ser muy diferente al de muchas otras que he tenido el placer de leer en estos cuatro años. Me parece recordar que la mayoría empiezan diciendo algo como: “Nunca creí que escribiría estas frases”. Hace dos años pensé que el llegar a escribir estas palabras y en especial todo el texto que viene a continuación era una ilusión poco probable. La verdad es que el sueño se ha hecho realidad gracias al apoyo, ayuda y comprensión que he recibido de todas las personas que están a mí alrededor, que sin pedir nada a cambio, se han implicado en esta tesis como si de un objetivo propio se tratara. Por este motivo, quisiera agradecerles su apoyo y dedicarles este trabajo que tanto tiempo, esfuerzo, penas y alegrías me ha costado, ya que de una forma u otra cada una de ellas ha aportado su granito de arena para que esto llegara a su fin.

En primer lugar quiero agradecer la confianza, el ánimo y el apoyo prestado durante todo este tiempo al Dr. Alberto Tejedor, director de esta tesis. Gracias Alberto por todas tus explicaciones y enseñanzas, por tu dedicación y tu paciencia, por tus críticas y consejos, y sobre todo por enseñarme a disfrutar de la ciencia con entusiasmo. Al Dr. Alberto Lázaro, Alberto, Alfí o Alf, por TODO. Nunca podré llegar a agradecerte lo suficiente todo lo que has hecho por mí. Sin tu dirección, sin tu implicación y preocupación total desde el principio, sin tu espíritu luchador contagioso, sin tu humor, sin tus instrucciones, sin tu llevarme de la mano en todo momento, sin tus consejos, sin tus ánimos y sobre todo sin tu amistad, esto no hubiese sido posible. Gracias de corazón, sabes que tienes una amiga aquí para siempre.

La verdad es que el ser quien soy, el haber acabado la tesis y el llegar a ser doctora se lo debo todo a mis padres. Gracias Papá y Mamá por sacrificaros en todo momento por mí, por que nunca me faltara nada. Gracias por la educación que me habéis dado (ojala yo lo hago con mis hijos la mitad de bien que lo habéis hecho vosotros conmigo). Gracias por aguantar mis malas caras y mi mal humor. Gracias por vuestros consejos, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida, por dármelo todo sin pedir nada a cambio; en conclusión, gracias por ser unos padres maravillosos. A mis hermanos Jesús y Fátima que han sido tan importantes en todo momento. Jesús gracias, porque aunque normalmente no te enteres de nada, sé que siempre estás ahí y que puedo contar contigo para lo que necesite. Gracias por tu apoyo, tus ánimos y tu humor “amarillo” (creo que ya he acabado de escribir las cien hojitas). A mi Fati. Sabes que admiro tu fortaleza, tu espíritu y tu capacidad de superar los problemas, eres uno de los mayores apoyos que he tenido y que siempre tendré. Como te voy a echar de menos cuando no estemos juntas, ¿quién me va a chincar entonces?

Al resto de mi familia tíos, primos, sobrinos, suegros y cuñados. En especial a mi Títo, que tanto nos quiere. Gracias tía por haber estado siempre ahí y por animarme en todo momento. A mis tíos Miguel y Rosi que siempre me han dado palabras de aliento y me han animado a continuar. A mis tíos José, Marisa, Según y Feli por preguntarme, preocuparse y levantarme el ánimo cuando lo he necesitado. A mis primos, Noe, Víctor y Sandra, sois geniales gracias por todo. A mi cuñado Víctor, por interesarse en todo momento por como lo llevaba y que tal estaba. A Vero, aunque la relación que mantenemos es distinta, gracias por los ánimos que me diste en los comienzos. A mi futura familia política, por entenderme y apoyarme siempre. A mis sobris porque sois una alegría. Y por último a mi abu, que ya no está con nosotros. Abu ¿lo ves como el estudiar tanto servía para algo?

A todos mis compañeros del laboratorio de nefro. A Ana, mi primera maestra. Gracias Anita por enseñarme con esa dulzura y paciencia que te caracteriza, eres única lo sabes, no cambies nunca. A Carmen, por su apoyo, su ánimo, su alegría, su entusiasmo, su comprensión y su carácter tan explosivo y admirable. En una ocasión dijiste “todo lo que hiciste me ha servido, espero que los demás puedan decir lo mismo de mí”. Ese momento ha llegado, gracias Carmen por que todo lo que hiciste me ha servido. A Ramiro y a José, porque sin vuestras bromas, sin vuestras risas y sin vuestra compañía todo este tiempo no hubiese sido lo mismo. Y por último a mi Blanqui. Gracias por haber estado tan pendiente de que estuviese bien, de que no me viniera abajo al final del camino, gracias por tus abrazos cuando más los he necesitado, gracias por tu apoyo incondicional y muchísimas gracias por haber aguantado la charla de San Sebastián un millón de veces. ¿Preparada para que empiece a ensayar la tesis?

También he de agradecer la cercanía del resto de compañeros del experimental. A Laura, Ana, Rosa, Mónica, Noemí, Marta y Usue que coincidimos en los principios. Gracias chicas por esas largas conversaciones sobre ciencia y sobre lo que no era ciencia, fuisteis un apoyo muy importante. Al grupo de “inmuno”, Lorena, Amaya, Isa, Julia y en especial Paloma, por ayudarme tanto con el citómetro y por vuestros consejos. A nuestro “confocalero” particular, al Dr. Rafael Samaniego. Muchas gracias Rafa por tu dedicación, por las conversaciones y clases magistrales sobre ciencia y todos los consejos que me has dado. A Yokito, por esa forma de ser que te caracteriza, por tu humor, por tu sonrisa y por tu cariño. Por supuesto, a mis tres chicos, a Julio, JuanAn y Dani. Julio gracias por preocuparte de mí desde el principio, por enseñarme en todo momento, por escucharme cuando lo he necesitado y por el ánimo que me has dado siempre, eres estupendo. A JuanAn, el último en llegar, una de las personas más imprescindibles en el laboratorio y que más me ha ayudado. No tengo palabras para describirte como científico pero aún menos como persona, lo único que te puedo decir es que no cambies nunca, y que me alegro enormemente de haberte conocido. A Dani (los galones más altos para el final). Simplemente gracias por ser como eres, por dar todo sin pedir nada a cambio, por estar siempre dispuesto, por ayudar cuando se te necesita, por solucionarme miles de problemas, por preocuparte por mí, por el ánimo, por el apoyo, por tener siempre una sonrisa, por... por todo, gracias. Al resto de los compañeros y personal del edificio. A Pancho, Julio, Antonio, Marichi, María Jesús, Miguel, Elena, Esmeralda, Marga, Charo, Mercedes, Natalia, Rosa, Mónica, Paco, José, Fernando, Juan, Mercedes, y a los chicos del grupo de los ingenieros que invaden nuestro labo. Gracias a todos por que sin vosotros no hubiese sido lo mismo.

Quiero agradecer de una forma especial toda la comprensión, el aguante, el apoyo y los ánimos que incondicionalmente me han ofrecido mis niñas, M<sup>a</sup> Fe, Olga, Paqui, Sara, Elena, Bárbara y Soraya y mis niños Dani, Chema y Héctor. Muchas gracias a todos por vuestra amistad, sois estupendos. A Gema que sin tener porque ha sacrificado su tiempo en ayudarme a estructurar y presentar esta tesis. Muchísimas gracias por todo.

En especial dejo para el final a la persona que más me ha comprendido, me ha ayudado y me ha apoyado desde que apareció en mi vida, a Iván. Gracias mi amor por siempre estar ahí y no fallarme nunca, por tener el don de hacerme sonreír en los momentos más difíciles, por hacer que luzca el sol brillante cuando yo sólo veo oscuridad. Gracias por ser mi bastón, mi paño de lágrimas, mi motor, mi razón de seguir, y sobre todo por haber decidido pasar el resto de tu vida conmigo, espero poder agradecerte todo lo que has hecho por mí...

Sonia ...

La nefrotoxicidad asociada al uso de determinados fármacos es un problema clínico que limita la dosis, la eficacia y el tiempo de tratamiento de los mismos. Por tanto, la búsqueda de estrategias de nefroprotección frente a la toxicidad producida por distintos fármacos es de gran interés. En esta tesis hemos estudiado *in vitro* e *in vivo* el efecto nefroprotector ejercido por cilastatina, un inhibidor competitivo de la dehidropeptidasa I presente en el borde en cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal. En células en cultivo, el tratamiento con cilastatina redujo los cambios asociados con la muerte celular, como son: alteración de la función mitocondrial, activación de la fragmentación nucleosomal, reducción de la viabilidad celular y modificación morfológica. Los datos presentados sugieren que cilastatina limita la entrada de los tóxicos al interior celular por mecanismos aún no bien definidos. Los resultados obtenidos *in vivo* en un modelo de fracaso renal agudo inducido por cisplatino en ratas, confirmaron el efecto nefroprotector. La pérdida de peso, los niveles de creatinina plasmática, BUN, proteinuria, la capacidad de concentración urinaria y el daño histológico a nivel renal fueron reducidos por el tratamiento con cilastatina. En conjunto, estos resultados demuestran que cilastatina podría ser empleada como agente nefroprotector, es decir, la coadministración de cilastatina podría paliar la nefrotoxicidad producida por fármacos de uso común en clínica, permitiendo que tanto la dosis como el tiempo de tratamiento no se vieran comprometidos.

---

**Summary**

Nephrotoxicity induced by certain drugs is a clinical problem that limits the dosage, the efficacy and the duration of treatment. Therefore, the search for nephroprotective strategies to avoid toxicity associated with different drugs is a great interest. In this thesis, we have studied, *in vitro* and *in vivo*, the nephroprotector effect exerted by cilastatin, a competitive inhibitor of dehydropeptidase I localized in the brush border of epithelial proximal tubular cells. In cultured cells, the treatment with cilastatin reduced the changes related with cell death, such as: mitochondrial alteration function, nucleosomal fragmentation, reduction of cell viability and morphological changes. The present data show that cilastatin limits the cellular toxics uptake via not well defined mechanisms. The results obtained *in vivo* in acute kidney failure model induced by cisplatin in rats, confirmed the nephroprotector effect. Loss weight, circulating creatinine levels, BUN, proteinuria, the ability to concentrate urine and renal damage at histological level was reduced by cilastatin treatment. Overall, these data demonstrate that cilastatin could be used as nephroprotector agent, for all this, co-administration of cilastatin might alleviate the neprotoxicity produced by differents drugs frequently used in the clinic, improving both the dose and treatment duration.



## **ÍNDICE**

<b>I.- ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>II.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
1.- EL RIÑÓN Y EL TÚBULO RENAL: FISIOPATOLOGÍA .....	5
1.1.- EL RIÑÓN .....	5
1.2.- EL FRACASO RENAL .....	6
1.2.1.- Peculiaridades de las células tubulares.....	7
1.2.2.- Fracaso Renal Agudo Tóxico.....	8
1.3.- APOPTOSIS Y TÚBULO PROXIMAL.....	10
1.3.1.- Apoptosis vs. Necrosis .....	10
1.3.2.- Compartimentalización de la apoptosis.....	11
2.- NEFROTÓXICOS .....	15
2.1.- INMUNOSUPRESORES LIGANDOS DE INMUNOFILINAS .....	15
2.1.1.- Ciclosporina .....	15
2.1.2.- Tacrolimus .....	16
2.2.- ANTIBIÓTICOS.....	16
2.2.1.- Aminoglucósidos: Gentamicina .....	16
2.2.2.- Glicopéptidos: Vancomicina .....	17
2.3.- CITOSTÁTICOS .....	17
2.3.1.- Cisplatino .....	17
2.4.- ANALGÉSICOS .....	18
2.4.1.- Paracetamol .....	18
2.5.- OTROS NEFROTÓXICOS .....	18
3.- CILASTATINA Y SU EFECTO NEFROPROTECTOR .....	19
3.1.- IMIPENEM – CILASTATINA.....	19
3.1.1.- Perspectiva histórica .....	19
3.1.2.- Cilastatina: estructura y función.....	19
3.2.- DEHIDROPEPTIDASA I.....	20
3.2.1.- Estructura, localización y función .....	20
3.2.2.- Transporte apical basado en balsas de colesterol .....	21
3.3.- EVIDENCIAS DE NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA .....	23
3.3.1.- Interacción con Ciclosporina.....	23
3.3.2.- Interacción con Vancomicina.....	24
3.3.3.- Interacción con Cisplatino.....	24
<b>III.- HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.- OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>

<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>V.I.- MODELO IN VITRO: TOXICIDAD Y PROTECCIÓN .....</b>	<b>30</b>
1.- CULTIVOS CELULARES.....	31
1.1.- CÉLULAS RENALES.....	31
1.1.1.- Aislamiento de túbulos proximales .....	31
1.1.2.- Cultivo primario de células del túbulo proximal.....	32
1.1.3.- Cultivo secundario de células del túbulo proximal .....	33
1.2.- CÉLULAS NO RENALES .....	33
1.2.1.- Células HeLa.....	33
1.2.2.- Linfocitos CD3+ .....	33
2.- FÁRMACOS EN ESTUDIO .....	34
2.1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS ....	36
3.- ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR .....	38
3.1.- MORFOLOGÍA .....	38
3.2.- CITOMETRÍA.....	38
3.2.1.- Videomicroscopía .....	38
3.2.2.- Citometría de flujo .....	38
3.3.- FRAGMENTACIÓN DEL ADN.....	39
3.3.1.- Actividad endonucleasa .....	39
3.3.2.- Enriquecimiento nucleosomal.....	39
3.4.- LIBERACIÓN DE CITOCROMO C.....	40
3.5.- ANEXINA-V .....	40
4.- ESTUDIOS DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	41
4.1.- POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	41
4.2.- MEDIDA DE LA TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA DE LA CADENA MITOCONDRIAL EN TIEMPO REAL.....	41
4.3.- MEDIDA DE LA CAPACIDAD OXIDATIVA CELULAR .....	42
5.- ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR .....	43
5.1.- IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS .....	43
6.- DINÁMICA DE BALSAS DE COLESTEROL.....	43
7.- ESTUDIOS DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE FÁRMACOS.....	44
8.- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE CISPLATINO POR SEC-ICP-MS .....	44
9.- ESTUDIOS DE PROTEÍNAS: WESTERN BLOT.....	45
<b>V.II.- MODELO IN VIVO: TOXICIDAD Y PROTECCIÓN .....</b>	<b>46</b>
1.- MODELO DE FRA POR CISPLATINO .....	47
1.1.- DISEÑO DEL MODELO ANIMAL .....	47
2.- EXTRACCIÓN, PROCESAMIENTO Y ALMACENAJE DE LAS MUESTRAS .....	49
3.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO Y ORINA .....	49
4.- DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA .....	50

5.- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS .....	50
<b>V.III.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>51</b>
1.- MODELO <i>IN VITRO</i> .....	52
2.- MODELO <i>IN VIVO</i> .....	52
<b>VI.- RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>VII.- ESTUDIOS IN VITRO .....</b>	<b>54</b>
1.- NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA. BÚSQUEDA DE DOSIS. ESTUDIOS PRECLÍNICOS .....	55
1.1.- DINÁMICA DE CRECIMIENTO CELULAR .....	55
1.1.1.- Efecto de cilastatina sobre la dinámica de crecimiento celular en cultivos tratados con nefrotóxicos .....	56
1.2.- INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR .....	58
2.- ESPECTRO DE TOXICIDAD PROXIMAL: SELECCIÓN DE FÁRMACOS .....	59
3.- EFECTO DE LOS NEFOTÓXICOS A NIVEL CELULAR. PROTECCIÓN POR CILASTATINA.....	62
3.1.- CAMBIOS ESTRUCTURALES .....	62
3.2.- CAMBIOS FUNCIONALES.....	66
3.2.1.- Cilastatina reduce la interferencia de los tóxicos con la cadena mitocondrial .....	66
3.2.2.- Cilastatina protege la integridad funcional de la mitocondria frente al ataque nefrotóxico.....	69
3.3.- CILASTATINA IMPIDE O REDUCE LA APOPTOSIS CELULAR .....	73
3.3.1.- Cilastatina impide o reduce la fragmentación del ADN y la aparición de nucleosomas en el citosol .....	73
3.3.2.- Cilastatina impide o reduce la muerte celular por anoikis .....	75
3.4.- CILASTATINA MEJORA LA CAPACIDAD REGENERATIVA CELULAR TRAS LA AGRESIÓN PRODUCIDA POR LOS NEFROTÓXICOS. EFECTOS EN LA VIABILIDAD CELULAR.....	77
3.4.1.- Efecto de cilastatina sobre el número de unidades formadoras de colonias tras la agresión de los distintos tóxicos .....	77
3.4.2.- Cilastatina restaura la capacidad oxidativa mitocondrial del túbulo proximal. Ensayo de viabilidad celular .....	84
4.- CILASTATINA PROTEGE DE LA NEFROTOXICIDAD EJERCIDA POR LOS FÁRMACOS, AL INTERFERIR CON SU TRANSPORTE AL INTERIOR CELULAR.....	85
4.1.- DISMINUCIÓN DE LA ENTRADA DE FÁRMACOS AL INTERIOR CELULAR .....	85
4.2.- REDUCCIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE LAS BALSAS DE COLESTEROL MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE CILASTATINA CON LA DHP-I .....	87
5.- ESPECIACIÓN DE CISPLATINO .....	89
6.- EL EFECTO NEFROPROTECTOR DE CILASTATINA ES ESPECÍFICO DEL	

TÚBULO PROXIMAL .....	91
6.1.- CILASTATINA Y CÉLULAS HELA .....	91
6.2.- CILASTATINA Y LINFOCITOS .....	92
<b>VI.II.- ESTUDIOS IN VIVO .....</b>	<b>94</b>
1.- MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> : PROTECCIÓN POR CILASTATINA FRENTE A LA NEFROTOXICIDAD DE CISPLATINO .....	95
1.1.- CILASTATINA REDUCE LA PÉRDIDA DE PESO PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO.....	95
1.2.- CILASTATINA REDUCE EL DETERIORO DE LA FUNCIÓN RENAL PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO .....	96
1.2.1.- Determinación de parámetros en suero .....	96
1.2.2.- Determinación de parámetros en orina.....	97
1.2.3.- Determinación del aclaramiento de creatinina .....	97
1.2.4.- Morfología renal .....	98
<b>VII.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>102</b>
1.- NEFROTOXICIDAD .....	103
2.- NEFROPROTECCIÓN .....	104
3.- EVIDENCIAS PREVIAS DEL EFECTO NEFROPROTECTOR DE CILASTATINA.	105
4.- EFECTOS RENALES DE CILASTATINA.....	107
5.- AMPLIANDO LA COBERTURA DE CILASTATINA: SELECCIÓN DE NEFROTÓXICOS.....	107
6.- TÓXICOS, DAÑO CELULAR Y PROTECCIÓN RENAL .....	109
7.- ESPECIFICIDAD DE LA PROTECCIÓN .....	112
8.- EVIDENCIAS PRECLÍNICAS: MODELOS ANIMALES .....	113
9.- MECANISMOS DE LA PROTECCIÓN RENAL POR CILASTATINA .....	115
9.1.- RESUMEN .....	116
<b>VIII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>118</b>
<b>IX.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>120</b>
<b>X.- ANEXO.....</b>	<b>132</b>

## **I. - *ABREVIATURAS***

---

**RELACIÓN DE ABREVIATURAS QUE APARECEN EN EL TEXTO**

<b>ABTS:</b>	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ADNasa:</b>	Desoxirribonucleasa.
<b>ADP:</b>	Adenosin-difosfato.
<b>Apaf:</b>	Factor activador de proteasas apoptóticas ("Apoptotic Protease-activating Factor")
<b>APES:</b>	(3-Amidopropil)triethoxi-silano.
<b>ARNasa:</b>	Ribonucleasa.
<b>ATP:</b>	Adenosin-trifosfato.
<b>ATPasa:</b>	Adenosin trifosfatasa.
<b>BDC:</b>	Balsas de colesterol.
<b>BUN:</b>	Nitrógeno ureico.
<b>Cav-1:</b>	Caveolina 1.
<b>CCCP:</b>	Carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona.
<b>CDX:</b>	Ciclodextrina.
<b>CsA:</b>	Ciclosporina A
<b>CTP:</b>	Células Tubulares Proximales.
<b>DAPI:</b>	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
<b>DHP-I:</b>	Dehidropeptidasa I.
<b>DMF:</b>	Dimetil Formamida.
<b>DMSO:</b>	Dimetil sulfóxido.
<b>DPH:</b>	1,6 difenil-1,3,6 hexatrieno.
<b>DTT:</b>	Ditiotreitol
<b>ECL:</b>	Activación de la quimiluminiscencia ("Enhanced Chemiluminescence").
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético ("EthyleneDiamine TetraAcetic acid").
<b>EEM:</b>	Error estándar de la media.
<b>ELISA:</b>	Inmunoensayo enzimático ("Enzyme linked immunosorbent assay").
<b>ERK:</b>	Proteínas kinasas reguladas por señales extracelulares.
<b>FADD:</b>	Proteína asociada a Fas con dominios de muerte.
<b>FPR:</b>	Flujo Plasmático Renal.
<b>FG:</b>	Filtrado glomerular.
<b>FRA:</b>	Fracaso Renal Agudo.
<b>FRC:</b>	Fracaso Renal Crónico.
<b>FSR:</b>	Flujo Sanguíneo Renal.
<b>GPI:</b>	Glicosil-Fosfatidil-Inositol.

<b>HIF:</b>	Factor inducible de hipoxia ("Hypoxia induced factor").
<b>I/C:</b>	Imipenem/Cilastatina.
<b>ICP-MS:</b>	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado.
<b>iNOS:</b>	Óxido Nítrico Sintetasa inducible.
<b>IP:</b>	Ioduro de propidio.
<b>ITDA:</b>	Instituto Tecnológico de desarrollo Agrario.
<b>JNK:</b>	Kinasa de tipo Jun N-Terminal.
<b>LPA:</b>	Ácido lisofosfatídico.
<b>MAPK:</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos ("Mitogen-Activate Protein Kinase").
<b>MORFs:</b>	Modificadores de la función de las balsas de colesterol.
<b>MSD:</b>	Merck Sharp & Dohme.
<b>MTT:</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
<b>NF-κB:</b>	Factor nuclear κB.
<b>NO:</b>	Óxido Nítrico ("Nitric Oxide").
<b>OATs:</b>	Familia de transportadores de aniones orgánicos ("Organic Anion Transporters family").
<b>OCTs:</b>	Familia de transportadores de cationes orgánicos ("Organic Cation Transporters family").
<b>PAF:</b>	Factor activador de plaquetas.
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino.
<b>PgP:</b>	Glicoproteína P.
<b>PMSF:</b>	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo.
<b>PPTM:</b>	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial.
<b>RA<sub>1</sub>:</b>	Receptores de adenosina tipo 1.
<b>RE:</b>	Retículo endoplásmico.
<b>ROS:</b>	Especies reactivas del oxígeno.
<b>SBF:</b>	Suero bovino fetal.
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>SEC:</b>	Cromatografía de exclusión de tamaño.
<b>SHU/PTT:</b>	Síndrome Hemolítico Urémico /Púrpura Trombocitopénica Trombótica.
<b>TAE:</b>	Tampón Tris-acetato-EDTA.
<b>TDx:</b>	Radioinmunoanálisis de polarización.
<b>VDAC:</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje ("Voltage-Dependent Anion Channel").
<b>WKY:</b>	Ratas Wistar-Kyoto.

## **II.- *INTRODUCCIÓN***

---



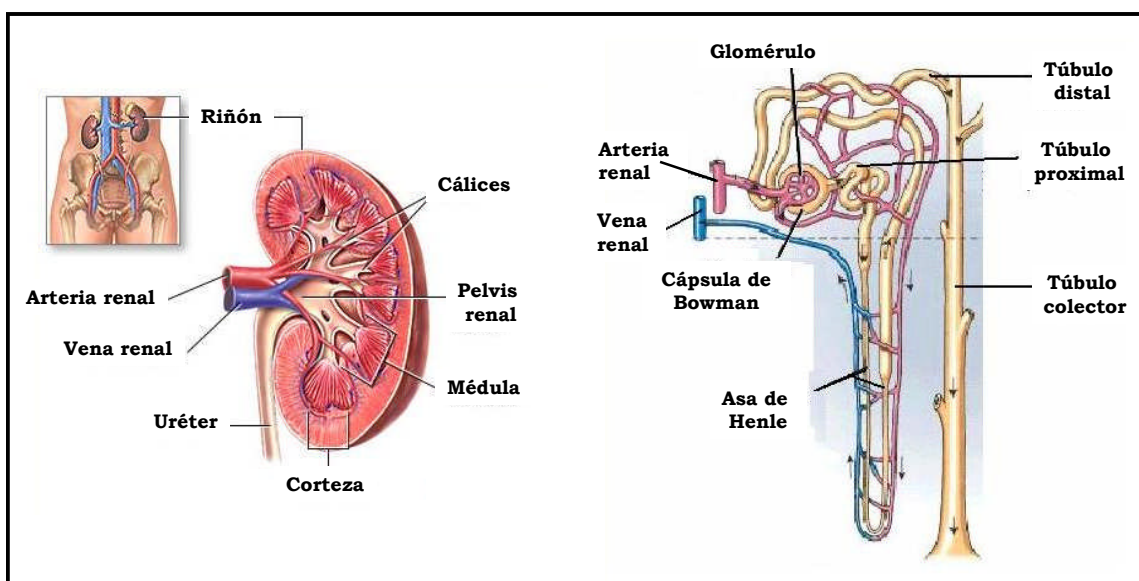
# 1.- EL RIÑÓN Y EL TÚBULO RENAL: FISIOPATOLOGÍA

## 1.1.- EL RIÑÓN

Los riñones son órganos pares excretores encargados de las siguientes funciones:

- ✓ Excretar en la orina tanto los productos no volátiles derivados del catabolismo, como cualquier sustancia extraña introducida en el organismo, o sus metabolitos, capaz de ser eliminada disuelta en agua.
- ✓ Regular la homeostasis global del organismo, ajustando la eliminación de agua, sodio, potasio y protones de la orina en función de la ingesta de los mismos.
- ✓ Secretar hormonas como eritropoyetina, renina y vitamina D, implicadas en la reparación cardiovascular, en el control de la volemia y en el equilibrio óseo.

Los riñones filtran el plasma de la sangre y permiten la excreción a través de la orina de diversos residuos metabólicos del organismo (como urea, creatinina, potasio y fósforo), por medio de unidades denominadas nefronas. La nefrona constituye la unidad estructural y funcional básica de los riñones. Su función principal es ultrafiltrar el plasma de la sangre, reabsorbiendo del filtrado lo que no debe ser eliminado, secretando aquello que siendo innecesario no ha sido filtrado y finalmente excretando el conjunto en forma de orina. Cada unidad está constituida por el corpúsculo renal o corpúsculo de Malpighi (formado a su vez por el glomérulo y la cápsula de Bowman), el túbulo proximal, las ramas descendente y ascendente del asa de Henle y el túbulo distal y el colector. Los corpúsculos renales y los túbulos proximal y distal se localizan en la zona cortical, mientras que los dos segmentos del asa de Henle y el túbulo colector se encuentran en la médula (Fig. 1).



**FIGURA 1. Fisiología renal.** En la izquierda, corte esquemático de la topografía general renal. A la derecha, localización cortical y medular de los componentes de la nefrona y del sistema de los conductos colectores.

La compleja diferenciación estructural y celular del túbulo se corresponde con el funcionamiento altamente especializado de cada segmento de la nefrona.

Los glomérulos filtran en el ser humano 180 litros de plasma al día, es decir, los 3 litros de plasma de la sangre pasan 60 veces al día por los filtros renales. Esto asegura que se filtran todos los elementos residuales y nocivos continuamente, y a medida que se producen. Pero no se pueden eliminar los 180 litros filtrados, luego, el túbulo renal debe extraer de ese volumen la mayoría del agua y toda la glucosa, fosfato, bicarbonato, aminoácidos y albúmina filtrados, para finalmente ajustar el volumen y la composición final de la orina, al volumen y composición de la ingesta.

A su paso por el túbulo, los 180 litros de ultrafiltrado plasmático se transforman en 1 ó 2 litros de orina donde la osmolaridad varía desde 50 hasta 1200 mOsm/kg.

Este método de funcionamiento hace del riñón un órgano enormemente adaptable, pero también susceptible a varios tipos de lesión:

- ✓ el túbulo proximal reabsorbe el 80 % del ultrafiltrado. Muchos tóxicos que alcanzan la luz tubular pueden lesionar este segmento en su paso transcelular.
- ✓ el asa ascendente de Henle construye el gradiente osmótico medular a expensas del bombeo activo de  $\text{Na}^+$ . Es un epitelio impermeable, con mucho consumo energético que le hace dependiente del  $\text{O}_2$  y sensible a isquemia y a hipoxia. En sus inmediaciones están los sensores de  $\text{O}_2$  que determinan la síntesis de eritropoyetina.
- ✓ el túbulo colector es el último segmento de la nefrona. En situaciones de antidiuresis o de ahorro de agua, los tóxicos presentes en la luz tubular pueden llegar a concentrarse 200 veces con respecto a su concentración plasmática. Es sensible a la precipitación o cristalización de fármacos de baja solubilidad a pH ácidos.

## **1.2.- EL FRACASO RENAL**

Las enfermedades renales afectan a las nefronas de modo agudo, subagudo o crónico, destruyéndolas y reduciendo su capacidad de excreción.

Existen varios tipos de nefropatías según la estructura del riñón que se vea afectada con más intensidad (glomerulo, túbulo o vaso). Independientemente de la nefropatía, la consecuencia más temida del daño renal es el fracaso de las funciones del riñón, que puede ocasionar la muerte del paciente. La lesión a las nefronas puede suceder rápidamente como resultado de lesión isquémica, oxidativa, inflamatoria o tóxica, produciendo fracaso renal agudo (FRA), pero la mayoría de las nefropatías destruyen las nefronas lenta y silenciosamente, causando fracaso renal crónico (FRC).

El FRC se produce por el daño permanente e irreversible de la función de los riñones, definido por un índice de filtrado glomerular (FG) bajo. Se caracteriza por una pérdida del tamaño de los riñones por una reducción de células parenquimatosas renales (atrofia glomerular y tubular), con un aumento de matriz extracelular y del número de fibroblastos y leucocitos (fibrosis e inflamación). En el FRC, el FG se deteriora a lo largo de tres o más meses o incluso años.

El FRA que causa deterioro del filtrado renal en días o semanas, también puede evolucionar algo más lentamente deteriorando el filtrado en meses (siempre en más de tres meses), en cuyo caso recibe el nombre de fracaso renal subagudo. Se caracteriza por oliguria y alteraciones del balance del agua, electrolitos y fluidos corporales. Tras un periodo de disfunción renal variable (1 y 3 semanas), el FRA suele revertir. Si no es así, al cabo de tres meses de falta de reversión, se habla de evolución de FRA a FRC y puede llegar a ser necesaria la diálisis. En el FRA hay cambios morfológicos que incluyen muerte celular, inflamación, regeneración, atrofia tubular, pérdida del borde en cepillo, aparición de cilindros tubulares, generación de edema intersticial, y acúmulo de leucocitos en los vasa recta <sup>122</sup>. En el túbulo, los cambios morfológicos son compatibles con una necrosis o necroapoptosis tubular aguda, donde agresiones tóxicas, inflamatorias u oxidativas confluyen en vías comunes de daño celular.

Desde un punto de vista fisiopatológico el FRA se clasifica en:

**TABLA 1. Causas del FRA.**

<b>PRE-RENAL</b>	Disminución de la perfusión sanguínea renal. Células tubulares intactas.	Hipoperfusión renal Deshidratación Insuficiencia cardíaca Quemaduras
<b>RENAL</b>	Existe una lesión orgánica de las células tubulares renales. Puede ser resultado de múltiples tipos de agresión.	<u>Isquémico</u> <u>Hemodinámico</u> <u>medicamentoso</u> : Aines, diuréticos. <u>Tóxico</u> : contraste iodado, aminoglucósidos, anfotericina, vancomicina, quimioterápicos, inhibidores de calcineurina. <u>Vascular</u> : vasculitis, SHU/PTT, infarto renal. <u>Inmunológico</u> : nefritis alérgica, enfermedad sistémica.
<b>POST-RENAL</b>	Obstrucción de las vías urinarias	Crecimiento prostático Tumores Traumas

### **1.2.1.- Peculiaridades de las células tubulares**

El riñón es uno de los órganos más susceptibles al efecto de toxinas debido a una amplia vascularización, un elevado flujo sanguíneo, mucha superficie glomerular y tubular (gran absorción de la toxina), un elevado transporte tubular, un sistema de concentración de sustancias intracelular, varios sistemas enzimáticos que convierten los productos no tóxicos en tóxicos para la célula renal, y una elevada actividad metabólica que hace vulnerables a las células renales a una privatización de oxígeno.

La nefrona está formada por distintos tipos celulares con diferentes estructuras, funciones y metabolismo. Por lo tanto, la concentración de la toxina, su metabolismo en el riñón, y el daño ocasionado a éste, varía considerablemente con un patrón discontinuo de distribución entre los distintos compartimentos intrarenales.

Las células tubulares proximales (CTP) modifican la composición del plasma ultrafiltrado al reabsorber su mayor parte y secretar ciertas moléculas. Las CTP llevan a cabo la mayoría del transporte secretor de moléculas que tiene lugar en el túbulo. Existen transportadores reversibles basolaterales, relativamente inespecíficos, que

permiten extraer aniones o cationes desde la vertiente capilar hacia la célula para su secreción, o hacer el camino contrario para su reabsorción. Existe un sistema apical de bombeo activo basado en P-glicoproteínas (PgP) de la familia MDRD (*Multidrug resistances domains*), para bombear de nuevo hacia la luz sustancias indeseables y xenobióticos, ya procedan de la extracción basolateral o de una reabsorción apical indeseada. Esta función requiere células ricas en transportadores de membrana y mitocondrias que producen la energía demandada por dicho transporte. Esto convierte a la mitocondria en diana de numerosas toxinas, debido a que los transportadores implicados aumentan la concentración de drogas citotóxicas en el interior de la célula tubular. Esta concentración es superior a la hallada en otros órganos, lo que provoca que la toxicidad de ciertas moléculas sea específica de túbulo proximal, como es el caso de ciertos antibióticos, inmunosupresores, quimioterápicos, analgésicos, etc.

### **1.2.2.- Fracaso Renal Agudo Tóxico**

El FRA es un síndrome clínico que cursa con un deterioro brusco de la función renal glomerulotubular. Se caracteriza por una retención de productos nitrogenados, derivados del catabolismo proteico, y por una incapacidad para mantener la homeostasis corporal de líquidos, electrolitos y equilibrio ácido-base. La muerte y desprendimiento de CTP puede llegar a taponar el mismo, aumentando retrógradamente la presión hidrostática y reduciendo el FG. Por otro lado, los solutos no reabsorbidos en los segmentos proximales aumentarán la carga distal, estimulando el transporte a nivel de una estructura especializada del túbulo distal, conocida como mácula densa, localizada junto a la arteriola aferente del glomérulo. Cuando la lesión de la nefrona aumenta la oferta de solutos a la mácula densa, ésta aumenta la concentración de adenosina local, reduciendo el FG a través de una vasoconstricción de la arteriola aferente dependiente de receptores A-1 (receptores de adenosina) localizados en la misma. Este mecanismo conocido como “feed-back” túbulo-glomerular contribuye con la obstrucción tubular a la reducción del FG, cuyo marcador más característico es el incremento de las concentraciones séricas de creatinina y urea. Puede acompañarse de disminución o conservación de la diuresis <sup>24</sup>.

La incidencia de fracasos renales causados por toxinas (nefrotóxicas) ronda el 10% de los FRC, y el 20% de los FRA. Se define la nefropatía tóxica como alteración de la estructura y/o función renal causada por sustancias exógenas o endógenas.

Una vez la nefrona es sometida a toxinas, las células agredidas pueden responder de maneras distintas. Por un lado, pueden adaptarse a la agresión y acabar recuperando su función y por otro pueden no superar la agresión y morir. La dosis, la pauta de administración, varios parámetros farmacocinéticos que determinan la concentración del principio activo en el tejido diana y la susceptibilidad relativa de las células, son factores que modifican la actividad terapéutica o tóxica del fármaco. El devenir celular hacia el desarrollo de mecanismos de adaptación/supervivencia o

hacia la activación irreversible de vías de apoptosis, depende de un equilibrio tanto intracelular como extracelular que comienza a ser dilucidado.

En clínica, los fármacos más nefrotóxicos son ciclosporina (CsA), cisplatino, vancomicina y aminoglucósidos. Pueden ejercer una acción directa sobre la célula tubular, por unión a la membrana plasmática o captación celular, y una acción indirecta por liberación de mediadores vasoactivos y producción de isquemia <sup>3</sup>.

#### **1.2.2.1.- Nefrotoxicidad directa**

Hay sustancias que afectan directamente a la célula (citotoxicidad) alterando su permeabilidad, inhibiendo procesos enzimáticos, interfiriendo en la síntesis proteica y en ocasiones, alterando la actividad de las bombas de transporte.

La nefrotoxicidad directa puede estar producida por la respuesta celular a la presencia de la toxina. Cuando ésta se transporta al interior celular puede ejercer su acción sobre distintas estructuras donde puede alterar las propiedades biofísicas de los lisosomas modificando la permeabilidad de sus membranas <sup>37</sup> y provocar la liberación de enzimas lisosomales produciendo fosfolipidosis, destrucción del lisosoma y necrosis celular. Puede interferir con la función mitocondrial, modificando la oxidación de los sustratos que proveen de energía a la célula, la generación de ATP, la síntesis de radicales de oxígeno altamente reactivos (ROS) y la detoxificación mitocondrial del  $\text{Ca}^{2+}$ . En modelos experimentales de nefrotoxicidad producida por gentamicina y cisplatino, existen evidencias de necrosis celular tras la depleción de ATP <sup>74</sup>. En la nefrotoxicidad provocada por aminoglucósidos, cisplatino o CsA, los mecanismos iniciales implicados son más inciertos y pueden implicar ciclado de membranas o daño directo al ADN o a la mitocondria.

#### **1.2.2.2.- Nefrotoxicidad indirecta**

Una parte sustancial del efecto final de numerosas sustancias sobre el FG se debe a la inducción de una disminución notable en el flujo sanguíneo renal (FSR). En la mayoría de los casos en los que tiene lugar este efecto, la acción de la toxina se ha atribuido a la liberación de factores vasoconstrictores (PAF, angiotensina II, endotelina, adenosina), o la inhibición de factores vasodilatadores (óxido nítrico, (NO)). La nefrotoxicidad inducida por distintos nefrotóxicos como CsA <sup>134</sup>, gentamicina <sup>133,42</sup> y cisplatino <sup>42</sup>, se ha relacionado con la estimulación de la síntesis y la liberación de PAF. Por otro lado, la angiotensina II se ha relacionado con la reducción del FG en tratamientos con gentamicina <sup>145</sup> y la activación de la retroalimentación túbulo-glomerular por adenosina en la vasoconstricción asociada a CsA <sup>24</sup>.

Otra forma de provocar nefrotoxicidad es disminuyendo la síntesis de NO, efecto demostrado en modelos de nefrotoxicidad por contrastes iodados y por CsA <sup>73,146</sup>.

Es probable que en muchas de las circunstancias donde se ha descrito una reducción del FSR por nefrotóxicos, se estuviese determinando la vasoconstricción aferente secundaria a la activación del “feed-back” túbulo-glomerular <sup>24</sup>.

### **1.3.- APOPTOSIS Y TÚBULO PROXIMAL**

La muerte celular es un proceso esencial en la homeostasis de un organismo. Su supervivencia depende de un balance entre la vida y la muerte de sus células.

La apoptosis constituye una medida fisiológica de recambio celular <sup>153</sup> bajo control genético, que se caracteriza por reducción del volumen celular, compactación de las organelas, condensación de la cromatina, degradación internucleosomal del ADN, exposición de fosfatidil-serinas en el lado externo de la membrana plasmática, formación de “cuerpos apoptóticos” y fagocitosis de los mismos por sus células vecinas o macrófagos <sup>2,144</sup> previniendo así una reacción inflamatoria <sup>84</sup>.

Sin embargo, la necrosis implica la ruptura de la membrana e hipoxia, lo que conduce a la disminución en las concentraciones de ATP, colapso metabólico, edematización y disolución de la célula produciendo inflamación.

La muerte celular tubular en estados tempranos del FRA de diferentes etiologías (isquemia, toxinas, sepsis) puede producirse por apoptosis o necrosis <sup>18,54,122,123,143,147</sup>.

El proceso de apoptosis se divide en 3 fases:

Fase de inducción. Tras una agresión es la propia nefrotoxina la que activa los mecanismos de apoptosis, pero no es responsable de los efectos secundarios durante la misma. El responsable es un efecto paracrino sobre las células vecinas, por el que estas células expresan receptores letales. Cuando la muerte tiene lugar en el punto de la agresión, la zona lesional se autolimita mediante la liberación de factores letales que inducirán muerte en células periféricas no dañadas, pero preseleccionadas durante la agresión. En estas células la supervivencia o muerte viene mediada por la interacción de ligandos de muerte liberados por células agredidas y sus propios receptores.

Fase efectora. Existen principalmente 3 vías efectoras según la toxicidad inicial, aunque al final los mecanismos acaban confluyendo: mitocondrial (apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) y liberación de factores proapoptóticos), nuclear y la vía del  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico (RE).

Fase de degradación. Se produce ruptura internucleosomal (180-200 pb) por endonucleasas <sup>34,161,166</sup>, condensación del citosol y modificaciones en la membrana.

#### **1.3.1.- Apoptosis vs. Necrosis**

Apoptosis y necrosis a menudo ocurren de manera simultánea en una variedad de patologías, como en cultivos celulares expuestos a activadores fisiológicos, toxinas y productos químicos <sup>106</sup>. Ciertos estímulos pueden inducir tanto apoptosis como necrosis (Fig. 2). Que un modo de muerte celular sea preferente sobre otro depende de la severidad de la lesión y del tipo celular <sup>11,22,100,106</sup>.

Estos dos procesos representan los dos extremos de una acción continua, donde una apoptosis parcial se puede convertir en necrosis y donde la inhibición de ciertas enzimas intermedias puede bloquear el desarrollo de la morfología de apoptosis, sin evitar la muerte celular necrótica final. Existen situaciones donde una célula

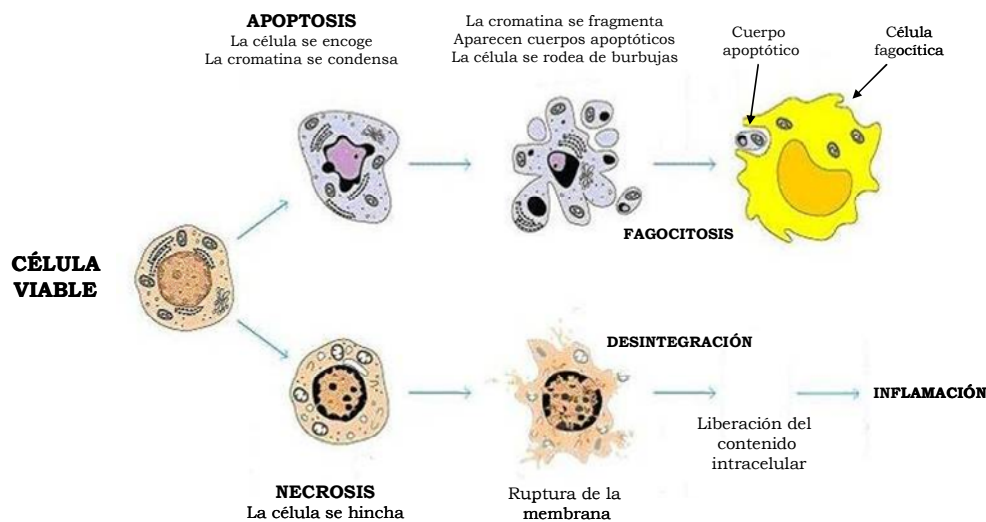
comprometida en apoptosis puede morir con características histológicas de necrosis:

- ✓ Deplección de ATP. Impide la apoptosis ya que ésta es un proceso activo que requiere energía. Si el número de mitocondrias afectadas supera un valor crítico, o si el consumo de ATP aumenta bruscamente, un proceso de apoptosis puede interrumpirse, apareciendo las características típicas de la necrosis <sup>100</sup>.

- ✓ Aparición de ROS. Pueden oxidar la cisteína de algunas caspasas, inactivándolas y transformando una muerte apoptótica en necrótica <sup>49</sup>.

- ✓ Caspasa 8. La activación de FADD por unión del receptor Fas a su ligando, puede producir necrosis en vez de apoptosis si se inhibe o está inactiva caspasa 8 <sup>82</sup>.

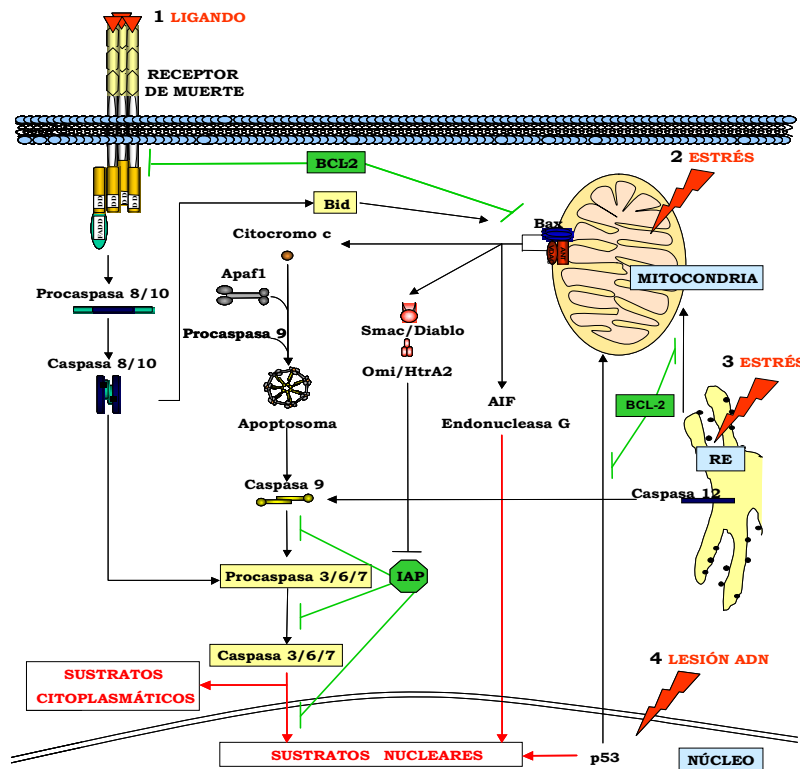
- ✓ Activación de fosfolipasa A2, inhibida por muchas caspasas en apoptosis <sup>103</sup>.



**FIGURA 2. Descripción del proceso de apoptosis vs. necrosis.**

### **1.3.2.- Compartimentalización de la apoptosis**

La decisión de sobrevivir y proliferar o morir por apoptosis es esencial durante el desarrollo, durante la homeostasis tisular y para proteger de un daño celular o genómico. La muerte celular por apoptosis es un proceso activo bajo control molecular regulado. Varias señales internas y externas pueden inducir apoptosis que se efectúa por diferentes vías. Básicamente, son dos vías paralelas; vía extrínseca o mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular y vía intrínseca o mitocondrial que es mediada por estrés celular. Ambas convergen en unas proteínas efectoras, las caspasas <sup>57</sup>, que conducen a la activación de la apoptosis. Sin embargo, la vía intrínseca puede desencadenar una apoptosis independiente de caspasas. En el daño renal se ha demostrado que participan en la inducción y regulación de la apoptosis, ligandos y receptores de la membrana celular, la mitocondria, el RE, el citosol y la activación nuclear de oncogenes proapoptóticos y antiapoptóticos. Esto significa que la apoptosis se encuentra compartimentalizada y se pueden separar sus eventos y estudiar los cambios morfológicos en cada compartimento (Fig. 3).



**FIGURA 3. Vías de inducción de muerte celular por apoptosis.** En general, son dos las vías que conducen a la ejecución de la apoptosis. Una es la vía extrínseca, mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular (1), y la otra es la vía intrínseca, mediada por estrés celular sobre la mitocondria (2) o el retículo endoplasmático (RE) (3) o por lesión en el ADN (4). Estas dos vías, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente. Ambas vías acaban dando lugar a la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados.

### 1.3.2.1.- Membrana citoplasmática

La membrana de las CTP realiza principalmente dos funciones, una en apoptosis y otra en respuesta a la agresión. En la membrana se hacen evidentes los efectos de las modificaciones bioquímicas de la apoptosis. La célula adquiere un aspecto apoptótico; disminuye de tamaño, se aísla de las células vecinas (si es adherente) y se redondea <sup>83,171</sup>. En la fase de degradación, se altera la simetría de fosfolípidos de membrana y se externaliza la fosfatidilserina, esto permite que la célula apoptótica sea reconocida y pueda ser fagocitada antes de liberar su contenido al exterior <sup>49,50,87,96,148</sup>.

La membrana plasmática mantiene los gradientes iónicos que a su vez regulan el volumen celular. Si se produce una agresión, la membrana se daña y entran iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y salen iones  $\text{K}^+$ . El agua y los cloruros se redistribuyen de acuerdo al gradiente electroquímico y hay un incremento neto intracelular del agua. Durante la agresión la célula expresa distintos receptores de membrana que tras la unión de sus ligandos pueden producir la activación de distintas vías de señalización.

### 1.3.2.2.- Mitocondria

La mitocondria participa generando ATP (necesario para morir por apoptosis) y ROS, detoxificando el  $\text{Ca}^{2+}$  en agresiones subletales, alterando la apertura del PPTM y liberando citocromo C, factores apoptogénicos y miembros de la familia Bcl-2 <sup>2,12</sup>. Su posición central en la translocación de todos estos factores desde y hacia el citosol y el núcleo, hace patente su relevancia en la compartimentación de la apoptosis.

A nivel molecular, en la mitocondria se disparan mecanismos del programa de apoptosis, y tienen lugar disfunciones en los procesos bioquímicos llevados a cabo por el orgánulo. Durante la apoptosis inducida en el túbulo proximal:



✓ Se produce desacoplamiento en la cadena de transporte de electrones, y detención del metabolismo energético que produce una caída en la producción de ATP.

✓ Se originan ROS capaces de inducir apoptosis. La principal fuente productora de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial, regulada por ADP y por el consumo de ATP <sup>3</sup>. La adición directa de ROS sobre el túbulo renal provoca apoptosis <sup>81,156</sup>. Varios estudios muestran que en CTP tratadas con cisplatino tiene lugar un aumento de ROS <sup>10</sup>. El NO al inhibir la citocromo C oxidasa aumenta la producción de ROS mitocondrial. La aparición de anión superóxido activa HIF-1, como respuesta protectora ante la hipoxia. Este efecto no tiene lugar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>39</sup>.

✓ Se libera citocromo C (marcador de lesión mitocondrial), en respuesta a estímulos pro-apoptóticos. Éste forma el apoptosoma junto a Apaf-1 y procaspasa 9, para dar lugar a caspasa 9 activa, y así, activar las caspasas efectoras 3, 6 y 7 <sup>98</sup>. Este hecho se ha observado en células tubulares expuestas a recalentamiento <sup>141</sup>, a hipoxia <sup>140</sup>, a tratamiento con estatinas o cisplatino <sup>17,124</sup> y en la isquemia/reperfusión que sufren los riñones de cadáver durante el trasplante <sup>28</sup>.

✓ Formación de poros por las proteínas de la familia Bcl-2.

✓ Un fallo en el mantenimiento del potencial de membrana, debido a la apertura del PPTM ha sido observado durante el recalentamiento de las CTP <sup>141</sup>. Se ha visto que CsA inhibe la apertura del PPTM por unión a la ciclofilina D, lo que impide que ésta se active por Ca<sup>2+</sup> y reclute a la translocasa de nucleótidos, necesaria para la formación del poro. En consecuencia aumenta el Ca<sup>2+</sup> mitocondrial que no puede ser detoxificado, se inhibe el intercambio de Na<sup>+</sup> por Ca<sup>2+</sup> que aumenta aún más el Ca<sup>2+</sup> libre mitocondrial y se reduce la disponibilidad mitocondrial de fosfato.

#### **1.3.2.3.- Retículo endoplásmico**

El estrés del RE puede inducir apoptosis <sup>68</sup>. El RE participa en la iniciación de la apoptosis al menos por dos mecanismos diferentes, en respuesta a proteínas desplegadas o a la movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup>. La caspasa 12 y proteínas de la familia de Bcl-2 se localizan en el RE y controlan la regulación de la apoptosis <sup>160</sup>.

El RE es el almacén de Ca<sup>2+</sup> principal de la célula. Oscilaciones en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el RE regulan múltiples niveles de la función celular normal <sup>53,108,126</sup>. La salida de Ca<sup>2+</sup> del RE es clave en muchos modelos de apoptosis. La procaspasa 12 se localiza en el lado citosólico del RE y se activa por estrés del mismo, pero no por señales apoptóticas mitocondriales <sup>116</sup>. La salida de Ca<sup>2+</sup> también influye en la sensibilidad de la mitocondria a sufrir apoptosis e inducir la liberación de citocromo C y la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial <sup>19,68</sup>.

El paracetamol puede producir daño renal al inducir apoptosis en las células epiteliales del túbulo proximal. Genera estrés en el RE caracterizado por la inducción y translocación al núcleo de GADD153 y la activación de la caspasa 12 <sup>101</sup>.

#### **1.3.2.4.- Citosol**

En apoptosis el citoplasma ejerce su papel principal en la fase efectora. En esta fase tiene lugar la activación genética controlada de mecanismos efectores que dan lugar a las características morfológicas y funcionales de la apoptosis.

La ejecución de la apoptosis no requiere transcripción de genes nuevos, ya que las proteínas necesarias ejecutoras de la misma, principalmente caspasas, se encuentran de forma latente en el citosol, o de forma inactiva o precursora en forma de procaspasas en distintas organelas hasta que son traslocadas al citosol u a otra organela. Esto produce una respuesta inmediata a señales apoptóticas.

En el citosol tiene lugar la condensación citoplasmática, el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, la activación del factor de transcripción antiapoptótico NF- $\kappa$ B implicado en la protección de la isquemia del túbulo proximal <sup>109</sup>, cambios en el citoesqueleto debido a la acción de caspasas sobre elementos encargados de mantener la estructura celular ( $\beta$ -actina, gelsolina y laminina A y B) y la acción de una familia de quinasas, MAPK (ERK, JNK, y p38), que modulan las vías apoptóticas, la parada del ciclo celular y la diferenciación tras señales extracelulares y/o de estrés. Parecen tener un papel en la determinación de las células tubulares tras un daño isquémico o tóxico al riñón <sup>139</sup>.

La alteración del citoesqueleto produce pérdida de polaridad celular, desaparición de dominios apicales y basolaterales en las CTP y pérdida de uniones estrechas entre ellas, produciendo por lo tanto cambios en el transporte vectorial.

#### **1.3.2.5.- Núcleo**

En el núcleo se activan o inhiben numerosos genes implicados en la regulación de la apoptosis, por medio de la traslocación al núcleo de factores de transcripción y enzimas reguladas en el citosol. La inhibición del factor NF- $\kappa$ B disminuye la actividad de varios factores de supervivencia renales como la insulina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y LPA <sup>13,97</sup>. Las MAP-Kinasas activadas pasan al núcleo y activan distintos factores de transcripción. Por ejemplo ERK activa a Elk, Myc y c-Jun y varios estudios han propuesto que la activación persistente de la vía ERK conduce a la anoikis <sup>36,176</sup> (apoptosis producida por pérdida de adhesión a la matriz). JNK activa a c-Jun, ATF-2, Elk-1, p53, Dpc4 y NFAT4, y p38 a ATF2, Elk-1, Chop y Max.

Durante la apoptosis, en el núcleo tiene lugar la fragmentación del ADN en subunidades regulares de 180-200 pares de bases o múltiplos de este tamaño, que resultan del corte al azar entre los nucleosomas. Para que la fragmentación tenga lugar, la caspasa 3 activa a la endonucleasa CAD (complejo ADNasa activado por caspasa) que se transloca al núcleo y es la encargada de fragmentar el ADN.

## **2.- NEFROTÓXICOS**

Dado su papel central para eliminar del organismo compuestos extraños y sus metabolitos, el riñón es vulnerable a lesiones tóxicas inducidas por fármacos. Estos tienen sus principales efectos sobre partes concretas de la nefrona, dependiendo de las diferencias regionales en el transporte, en la energética celular, en los procesos de reparación y en la capacidad de bioactivar o hacer no tóxicas las potenciales toxinas.

Dado que el objetivo de esta tesis es plantear estrategias concretas de nefroprotección sobre el túbulo proximal, se comentan a continuación las principales formas nefrotóxicas cuyo lugar primario de daño es el túbulo proximal.

### **2.1.- INMUNOSUPRESORES LIGANDOS DE INMUNOFILINAS**

Los inmunosupresores son fármacos utilizados para prevenir el rechazo de un órgano trasplantado y tratar enfermedades autoinmunes o de base inmune. Se dividen en varios grupos dependiendo del punto del sistema inmunológico en el cual ejerzan su acción inmunosupresora: inhibidores de las células presentadoras de antígenos (glucocorticoides), anticuerpos poli o monoclonales dirigidos contra la célula T o sus componentes, inhibidores de la expansión clonal (azatioprina, micofenolato) e inhibidores de las inmunofilinas. Estos últimos presentan como efecto secundario toxicidad renal, siendo los más utilizados en clínica CsA y tacrolimus.

#### **2.1.1.- Ciclosporina**

CsA es un endecapéptido cíclico que reduce la actividad del sistema inmunitario y el riesgo de rechazo. Se une a la proteína citosólica ciclofilina A de linfocitos inmunocompetentes (linfocitos T), para evitar la activación de la calcineurina, encargada de activar la transcripción de interleucina-2. También inhibe la producción de linfocinas, la liberación de interleucinas y la función de las células T-efectoras.

CsA actúa también sobre otras ciclofilinas, como la ciclofilina D mitocondrial. Su acción sobre la mitocondria inhibe la apertura del PPTM lo que conlleva un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial y una disminución del volumen mitocondrial. Éste efecto no es crítico para su acción inmunosupresora, pero es un factor importante en su nefrotoxicidad, ya que CsA puede inducir *in vivo* muerte de las CTP por apoptosis <sup>5,73</sup>.

CsA tiene una acción vasoconstrictora reversible sobre el riñón al reducir la dosis <sup>38</sup>. Esta vasoconstricción se debe principalmente a una retroalimentación túbulo-glomerular activada por el desplazamiento de solutos filtrados desde sus sitios de reabsorción proximales a otros más distales, consecuencia directa de la internalización de la bomba de sodio proximal inducida por CsA <sup>24</sup>. La nefrotoxicidad a largo plazo con CsA es irreversible y potencialmente progresiva. Por otro lado, CsA inhibe tanto la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) como la constitutiva de las CTP, y en consecuencia la síntesis de NO, agente vasodilatador que colabora en la vasoconstricción producida por CsA <sup>24,73</sup>.

### **2.1.2.- Tacrolimus**

Tacrolimus es un macrólido con un mecanismo de acción similar a la CsA, pero usualmente mejor tolerado y de 30 a 100 veces más potente. Se une a otra inmunofilina (FK binding protein), e inhiben la activación de la calcineurina.

Además de ser ambos inhibidores de la calcineurina, comparten sus efectos tóxicos sobre el túbulo proximal, provocando nefrotoxicidad al inducir apoptosis. Aunque esta similitud puede hacer pensar que el mecanismo inmunosupresor podría estar relacionado con su toxicidad, la inhibición de calcineurina no es crítica ni necesaria en la nefrotoxicidad <sup>165</sup>. Resultados previos de nuestro laboratorio, muestran un efecto directo de ambos sobre diferentes dianas mitocondriales con un resultado similar: el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial con apertura tardía y prolongada del PPTM. Otros autores han mostrado la inhibición de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa cuando las CTP son expuestas a tacrolimus y CsA *in vitro* <sup>164 95</sup>. Tacrolimus tiene efectos similares a CsA sobre la expresión y actividad de iNOS del túbulo proximal <sup>73</sup>.

A pesar de no tener estructuras químicas relacionadas, CsA y tacrolimus comparten la misma diana molecular, inhiben la expresión de los mismos genes y provocan los mismos efectos secundarios renales. Sin embargo, tacrolimus es superior a CsA a la hora de mejorar la supervivencia del trasplante y prevenir el rechazo agudo, pero incrementa la diabetes y los efectos secundarios neurológicos y digestivos <sup>169</sup>.

## **2.2.- ANTIBIÓTICOS**

De las clases de antibióticos y antibacterianos sintéticos existentes, como betalactámicos, quinolonas, macrólidos, sulfamidas, aminoglucósidos, o glicopéptidos, los dos últimos exhiben importantes nefrotoxicidades dependiendo de la dosis.

### **2.2.1.- Aminoglucósidos: Gentamicina**

Los aminoglucósidos producen daño renal al acumularse a nivel de la corteza, concretamente en las CTP. La toxicidad inherente y el potencial tóxico relativo de los aminoglucósidos están parcialmente relacionados con sus cargas eléctricas, positivas a pH fisiológico. En el volumen intracelular, el pH es incluso más bajo y las drogas son más catiónicas. Los aminoglucósidos penetran en el interior de las CTP por vesículas de clatrina tras su unión al borde en cepillo, posterior internalización, y acumulación lisosomal, donde se activan fosfolipasas lisosomales <sup>55</sup>, vacuolización citoplasmática y edema mitocondrial justo antes de la muerte celular <sup>71</sup>.

Existen una serie de factores de riesgo para desarrollar nefrotoxicidad por aminoglucósidos como son la edad, la existencia previa de enfermedades renales, la sepsis, la coadministración con otros fármacos, etc.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido útil para tratar infecciones causadas por gérmenes Gram-negativos, a pesar de que su uso se complica frecuentemente por la nefrotoxicidad que produce (aproximadamente en 15-30% de los tratamientos) <sup>107</sup>. Esta toxicidad se acompaña de peroxidación lipídica <sup>173</sup>.

La gentamicina se concentra en oído y riñón, por lo que produce efectos ototóxicos y nefrotóxicos. Se elimina principalmente por filtración glomerular y es reabsorbida por las CTP <sup>75</sup> mediante su unión a la membrana apical de dichas células por interacciones de carga y es acumulada en lisosomas. Los mecanismos de lesión renal descritos, inducen una disminución del ratio de filtración glomerular y un aumento de las resistencias vasculares sin muchas alteraciones histopatológicas <sup>71</sup> (probable activación del “feed-back” túbulo-glomerular).

### **2.2.2.- Glicopéptidos: Vancomicina**

Vancomicina es un glicopéptido de estructura compleja. Su acción es bactericida contra bacterias Gram-positivas, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana por la unión a los precursores de esta estructura. Su modo de acción es impedir la función de la transpeptidasa por impedimento estérico.

Su administración debe ser por vía endovenosa al no ser bien absorbida por vía oral. Aproximadamente el 30% de la vancomicina se une a proteínas del suero. Se distribuye bien por la mayoría de los líquidos corporales y un 90% se excreta por los riñones por filtración glomerular <sup>62</sup>, acumulándose en caso de insuficiencia renal y alcanzando niveles tóxicos. La incidencia de nefrotoxicidad asociada al tratamiento con vancomicina es baja (5-15%) cuando la función es normal y la droga es administrada sola <sup>61,135</sup>, pero cuando existe reducción basal del FG y se administra con aminoglucósidos o CsA la incidencia aumenta <sup>29,135</sup>.

## **2.3.- CITOSTÁTICOS**

Los citostáticos son fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas y tienen como función impedir la división de las células cancerosas. Muchas de ellas interfieren con distintas fases del crecimiento celular. Al dar inhibidores del ciclo celular se espera que las células con mayor tasa de mitosis como las células tumorales, sean afectadas pero es inevitable que se afecten también otras células normales con alta tasa de recambio como folículos pilosos, células del epitelio intestinal y células de la médula ósea. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su relativamente baja especificidad.

Muchos de los fármacos quimioterápicos o sus metabolitos se eliminan total o parcialmente por vía renal, y pueden producir lesiones en cualquier estructura que compone esta vía, no solo a nivel renal sino también en las vías urinarias.

### **2.3.1.- Cisplatino**

Uno de los citostáticos más utilizados en el tratamiento de tumores testiculares y ováricos metastásicos, carcinoma vesical avanzado de cabeza y cuello y otros, es el cisplatino <sup>7,35,76,150,167</sup>. Pertenece a una clase de medicamentos que contienen platino y

frena o detiene el crecimiento de las células cancerígenas formando cruces inter e intracatenarios en el ADN <sup>167,175,77,31</sup>.

El uso del cisplatino está limitado por dos factores: la resistencia de algunos tejidos tumorales al tratamiento, y los efectos severos que presenta sobre órganos sanos. La resistencia tumoral puede ser debida a una disminución de la entrada o a un incremento en la salida de cisplatino, a un aumento en la maquinaria de reparación del ADN, o a la falta de respuestas apoptóticas a señales de daño en el ADN <sup>80,149,150</sup>. El otro factor limitante es su nefrotoxicidad en términos de incidencia (25 – 40 % de los pacientes) y severidad <sup>136,7,31,41,104</sup> (principalmente en el túbulo proximal, ya que la concentración de cisplatino en estas células es 5 veces superior a la encontrada en suero) <sup>93</sup> y se relaciona con la acumulación del fármaco. La nefrotoxicidad dosis-dependiente puede encontrarse en uno de cada 3 pacientes tratados con cisplatino <sup>7,14</sup>. Clínicamente, la nefrotoxicidad causada por cisplatino aparece 10 días después de la administración de la droga, y se manifiesta como aumento de creatinina en suero, disminución de los niveles de potasio y magnesio en suero y disminución en el FG <sup>7,63,64,102</sup>. Este desciende hasta un 30% tras 3 ciclos de quimioterapia, impidiendo frecuentemente completar el 4º ciclo y obligando a sustituir al cisplatino por otros fármacos menos eficaces pero mejor tolerados <sup>127</sup>.

## **2.4.- ANALGÉSICOS**

Son los fármacos que se utilizan para calmar o eliminar el dolor.

### **2.4.1.- Paracetamol**

El paracetamol actúa principalmente inhibiendo ciclooxygenasas, cruciales en la producción de prostaglandinas (mediadores celulares responsables de la aparición del dolor). Posee propiedades analgésicas y antipiréticas, pero no antiinflamatorias.

El paracetamol se metaboliza principalmente en el hígado, y posteriormente es excretado por los riñones. La sobredosis de paracetamol ocasiona FRA, con una afectación tubular de predominio proximal. La ingesta crónica se ha asociado a FRC <sup>16,78,130</sup>. La nefrotoxicidad causada por el tratamiento de paracetamol es inicialmente independiente de la mitocondria y se centra principalmente en el RE. La presencia de paracetamol desencadena una respuesta de estrés en el RE que conduce al aumento de la expresión y activación del factor de transcripción GADD153 y a la activación de la caspasa 12, que va producir la activación de las caspasas efectoras 3 y 9 encargadas de llevar a cabo el proceso de apoptosis <sup>101</sup>.

## **2.5.- OTROS NEFROTÓXICOS**

Del resto de fármacos con toxicidad comprobada sobre el túbulo proximal, en este trabajo haremos referencia a ensayos preliminares sobre antifúngicos (anfotericina B), antivirales (foscarnet), contrastes iodados (iopamiro), diuréticos (manitol) y anestésicos (cloroformo).

### 3.- CILASTATINA Y SU EFECTO NEFROPROTECTOR

La nefrotoxicidad es un efecto secundario difícil de paliar. Actualmente no existen mecanismos de nefroprotección directos que protejan al riñón del daño causado por tóxicos. La solución en determinados tratamientos empieza por limitar la administración de la dosis, sustituir el fármaco por un análogo, (en la mayoría de los casos menos eficaz, pero también menos nefrotóxico) y por último suspender totalmente el tratamiento antes de que el daño renal sea irreversible. En los casos en los que el tóxico debe ser administrado a las dosis indicadas, se intenta disminuir la concentración del mismo en la orina induciendo una diuresis forzada.

#### 3.1.- IMIPENEM – CILASTATINA

##### 3.1.1.- *Perspectiva histórica*

En 1985 se introdujo en el mercado el primer antibiótico de la familia de los carbapenemes, el imipenem. Es un agente antibacteriano de la clase de los  $\beta$ -lactámicos con un amplio espectro de acción sobre patógenos Gram-negativos y Gram-positivos, aeróbios y anaeróbios y contra especies productoras de  $\beta$ -lactamasa.

El imipenem, al igual que otros antibióticos del grupo de los carbapenemes, sufre un extenso metabolismo dependiente de la especie, que se manifiesta por una baja recuperación de droga activa en la orina <sup>15,79</sup>. Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la biotransformación mayoritaria tenía lugar a través de la dehidropeptidasa I (DHP-I) <sup>46</sup> del borde en cepillo de las CTP <sup>170</sup>. La DHP-I hidroliza el anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem, inactivándolo <sup>79</sup>. Este fenómeno denominado metabolismo post excretor no afecta a las penicilinas ni a las cefalosporinas.

El espectro antibacteriano del imipenem era idóneo para tratar gérmenes Gram-negativos, en sepsis de origen intestinal o renal. La degradación renal de imipenem provocaba concentraciones subóptimas del fármaco activo en el tracto urinario <sup>89</sup>, limitando su uso en el tratamiento de infecciones sistémicas. Además, altas dosis de imipenem aislado en el túbulo proximal pueden producir toxicidad.

Estos hechos llevaron a producir un inhibidor potencial de DHP-I, lo que llevó al desarrollo de cilastatina, compuesto estructuralmente relacionado con el imipenem.

##### 3.1.2.- *Cilastatina: estructura y función*

La cilastatina es un inhibidor competitivo reversible de la DHP-I (Fig. 4d). Actúa inhibiendo la hidrólisis del enlace peptídico y la apertura de los anillos lactámicos. En presencia de cilastatina, la DHP-I no abre el anillo lactámico del imipenem, por lo que, evita su absorción aumentando la excreción urinaria de éste y reduciendo su concentración en el interior de la célula tubular <sup>15,32</sup>.

La coadministración de imipenem junto a cilastatina inhibe la degradación renal de éste, llegando a alcanzar una tasa de excreción urinaria del 70 % de la dosis administrada inicialmente de imipenem. Se estableció como dosis óptima una relación

1:1 de imipenem/cilastatina (I/C) para mantener la inhibición durante un intervalo de 8 a 10 horas <sup>120</sup>. Norrby, preconizó una serie de experimentos avalados por Merck Sharp and Domhe (MSD) donde se combinó I/C y se determinaron parámetros farmacodinámicos <sup>120</sup>. El pico en sangre de I/C se logra inmediatamente tras su administración, manteniéndose hasta 4 ó 6 horas. La concentración en suero y el área de la curva tiempo-concentración parece aumentar linealmente con las dosis. Estudios con múltiples dosis revelan que el fármaco no se acumula en sujetos sanos (Tabla 2).

**TABLA 2. Valores farmacocinéticos de cilastatina con imipenem** \*Datos extraídos de Drusano <sup>43</sup>.

Valores farmacocinéticos de cilastatina coadministrada con imipenem 1:1*	
Volumen de distribución en el compartimento central.	0.14 ± 0.03 L/Kg.
Concentración plasmática 1h postinfusión i.v.	19.1 ± 46 µg/mL
Vida media de eliminación.	0.84 ± 0.1 L horas.
Aclaramiento plasmático.	12.4 ± 1.1 L/hora por 1.73m <sup>2</sup>
Aclaramiento renal.	8.0 ± 1.2 L/hora por 1.73m <sup>2</sup>

La interacción de cilastatina con DHP-I se demostró al medir la síntesis de leukotrieno E4 formado por la acción de la DHP-I sobre el leukotrieno D4. Esta transformación se inhibía con cilastatina, lo que confirmó la especificidad de cilastatina por la DHP-I <sup>26</sup>.

Cilastatina también es capaz de inhibir de manera selectiva y dosis- dependiente sistemas de transporte de aniones orgánicos (OATs) a nivel basolateral, presentes en el segmento S2 del túbulo proximal renal <sup>47,158</sup>. Este efecto ha sido descrito recientemente, y se ha discutido su implicación en la liberación de otros fármacos con poco éxito, ya que el efecto esperado de su acción sobre los OATs sería la de aumentar los niveles circulantes de los fármacos implicados y reducir su aclaramiento global, exactamente lo opuesto a lo observado <sup>115</sup>.

### 3.2.- DEHIDROPEPTIDASA I

#### 3.2.1.- Estructura, localización y función

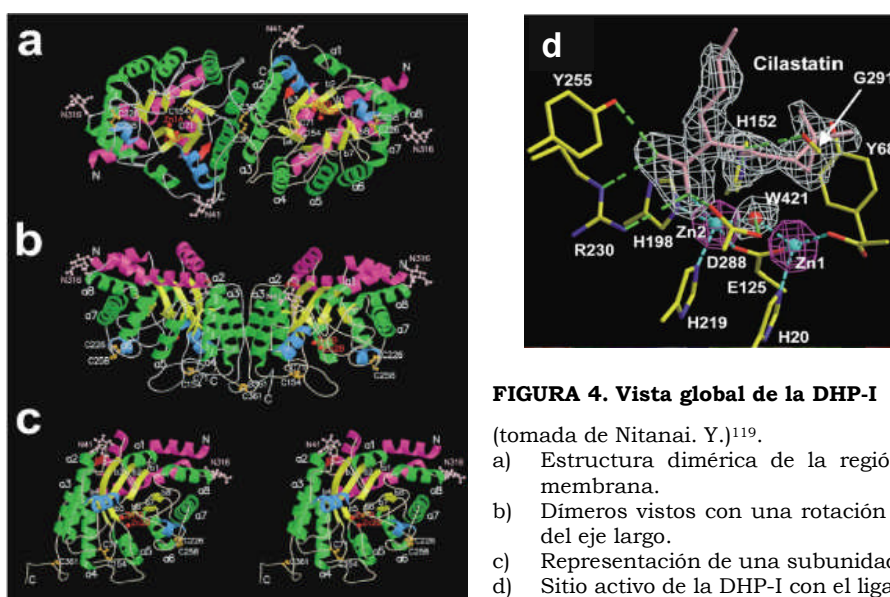
DHP-I es una glicoproteína implicada en la hidrólisis del enlace peptídico de los dipéptidos <sup>1,26,70</sup>. Se localiza principalmente en el borde en cepillo de las CTP, y también en pulmón, en gránulos de zimógeno del páncreas exocrino y en adipocitos de humano, cerdo y rata <sup>72</sup>.

La DHP-I es un homodímero con dos subunidades (α,β) constituidas cada una por un péptido de 369 aminoácidos de 42 KDa. Las subunidades tienen cuatro posibles lugares de glicosilación y puede presentar una forma altamente glicosilada de 63 KDa (Fig. 4). El sitio activo de cada una de las subunidades que componen el dímero (α,β) está compuesto por iones de zinc orientados hacia las microvellosidades



del túbulo renal <sup>119</sup>. DHP-I está implicada en el metabolismo renal del glutatión, en la conversión de leukotrieno D4 en leukotrieno E4 <sup>88</sup> y, es hasta el momento, el único enzima de mamíferos capaz de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico <sup>26</sup>. Cilastatina se une al sitio activo de la DHP-I, que es lo suficientemente específico como para requerir el reconocimiento preciso de un dipéptido como sustrato (Fig. 4D).

DHP-I se ancla a la membrana celular por un enlace covalente con un residuo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) <sup>1,52,157</sup>. El marcaje de la proteína con éste residuo en la traducción es importante en transducción de señales y reconocimiento <sup>121</sup>. Los residuos GPI se localizan típicamente en dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos llamados balsas de colesterol (BDC) o rafts lipídicos <sup>113</sup>. Son compartimentos localizados en la membrana ricos en determinados lípidos, como el colesterol. Los glicolípidos de las BDC se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones compactas, que a su vez se encuentran estabilizadas por puentes de hidrógeno. El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas disminuyendo su flexibilidad, compactando la estructura de la bicapa y modificando su fluidez <sup>110</sup>. Las BDC parecen estar implicadas en procesos de transporte transmembrana, endocitosis, señalización y en transducción de señales <sup>21,174</sup>.



**FIGURA 4. Vista global de la DHP-I**

(tomada de Nitanaï, Y.)<sup>119</sup>.

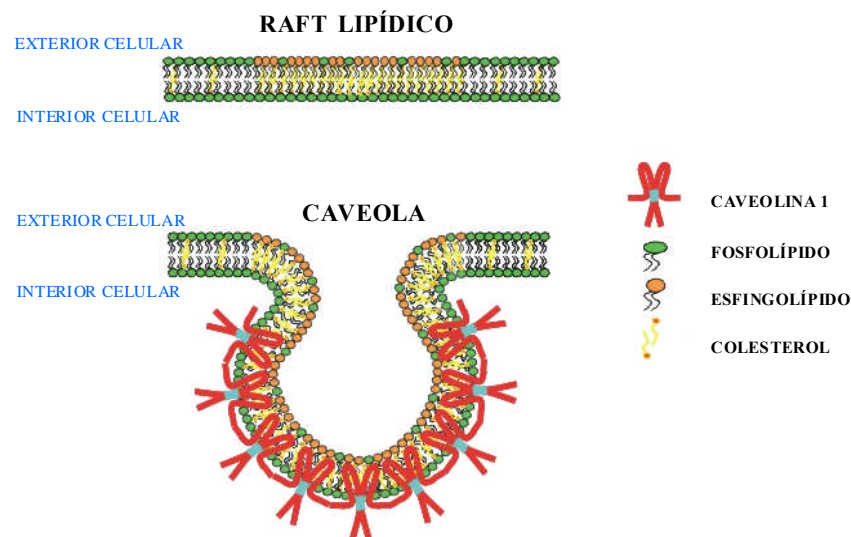
- a) Estructura dimérica de la región de unión a la membrana.
- b) Dímeros vistos con una rotación de 90° a lo largo del eje largo.
- c) Representación de una subunidad del monómero.
- d) Sitio activo de la DHP-I con el ligando cilastatina.

### 3.2.2.- Transporte apical basado en balsas de colesterol

En una misma célula coexisten diferentes clases de BDC lipídicas. Además de las clásicas BDC sin proteínas estructurales, estos dominios ordenados pueden estar enriquecidos en un componente proteico estructural, que cambia la morfología drásticamente y la función de la BDC. A esta clase emergente de proteínas se la denomina MORFs (*Modifiers of BDC fuction*). Las proteínas asociadas a BDC mejor caracterizadas son las caveolinas. Éstas son proteínas integrales de membrana de 21-25 KDa. Se conocen tres genes de caveolina, las caveolinas 1 y 2 que se expresan ubicuamente, mientras que la 3 se expresa únicamente en astrocitos y células

musculares <sup>33</sup>. La primera MORF identificada fue la caveolina-1 (Cav-1). Cav-1 está integrada en el microambiente de la BDC pero está además anclada por su dominio citoplasmático al citoesqueleto. Esta disposición permite que las BDC así estructuradas formen depresiones en forma de plato de 50-100 nm (caveolas) y puedan ser localizadas o desplazadas de modo regulado (Fig. 5).

Aunque las caveolas y las BDC comparten ciertas propiedades bioquímicas, las caveolas han sido consideradas tradicionalmente como una forma invaginada y vesicular específica de las BDC. La localización de la caveolina en las caveolas distingue estos dominios de membrana.



**FIGURA 5. Organización de las BDC y de las caveolas.** RAFT LIPÍDICO: la fase ordenada está enriquecida en colesterol y en la parte exoplásmica se orientan los esfingolípidos (esfingomielina y glicosfingolípidos). La fase desordenada está esencialmente compuesta de fosfolípidos, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. CAVEOLA: La integración de la proteína caveolina-1 forma las invaginaciones llamadas caveolas. Los monómeros de caveolina-1 se congregan en homo-oligómeros conteniendo aproximadamente 14 a 16 moléculas de caveolina individuales.

Desde su descubrimiento en los años cincuenta <sup>172</sup>, se ha especulado sobre la función de las caveolas. Han sido implicadas en numerosas funciones como endocitosis, homeostasis de lípidos, tumorigénesis, transporte/regulación del calcio, transporte/regulación del colesterol, transcitosis de albúmina y otras proteínas a través del endotelio <sup>132,152</sup>. Además las caveolinas interaccionan con las proteínas que residen en las caveolas, como por ejemplo con la NOS inducible <sup>132</sup>.

El modelo de transporte apical basado en las BDC está fundamentado en las relaciones lípido-lípido y lípido-proteína. Se ha sugerido que las BDC podrían ser importantes en el transporte a través de una ruta endocítica alternativa a la de las vesículas de clatrina, y podrían arrastrar en su transporte a elementos anclados en la misma como las proteínas marcadas con residuos GPI anteriormente mencionadas.

### 3.3.- EVIDENCIAS DE NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA

Aunque cilastatina se diseñó para impedir el efecto de DHP-I sobre el imipenem, y sólo se comercializaba combinada con el mismo (I/C), existen ciertas evidencias de que podría interactuar con otros fármacos a nivel del transporte renal.

#### 3.3.1.- Interacción con Ciclosporina

Desde la introducción de CsA y su combinación con otros inmunosupresores, ha mejorado notablemente la terapia inmunosupresora tanto en los trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea, como en numerosas enfermedades autoinmunes.

El principal efecto secundario de CsA es la nefrotoxicidad que afecta tanto al riñón nativo (trasplante no renal) como al trasplantado (trasplante renal) <sup>23</sup>. En ambos casos el efecto es dependiente de la dosis.

Su aplicación inicial fue en trasplante renal y aunque al inicio fue difícil diferenciar el daño renal provocado por el fármaco del daño inmunológico, se identificó que CsA provocaba nefrotoxicidad. Su uso en otros trasplantes permitió el estudio de su nefrotoxicidad sin los factores de confusión vistos en trasplante renal <sup>86</sup>.

En los años 80, parte de la investigación farmacológica sobre CsA iba dirigida a identificar y describir sus posibles interacciones medicamentosas con otras drogas de uso común en pacientes trasplantados o susceptibles de requerir inmunosupresión.

En 1987, Sido presentó la evidencia de que la asociación de I/C al tratamiento con CsA producía una disminución de la alteración de la función renal en ratas, mejorando la nefrotoxicidad inducida por CsA <sup>151</sup>. En 1989, Hammer repitió estas experiencias en ratas nefrectomizadas a las que sometió a trasplante renal. Las ratas trasplantadas tratadas con CsA sobrevivían, mientras que las ratas trasplantadas que no recibían inmunosupresor morían. Pero, si además se asociaba I/C a la CsA los animales presentaban una creatinina significativamente inferior <sup>69</sup>.

En 1994, Markewitz mostró la primera evidencia del posible efecto nefroprotector del uso de I/C contra la nefrotoxicidad por CsA en humanos sometidos a trasplante cardíaco. Se realizó un estudio prospectivo, aleatorizado, controlado con placebo y ciego sobre 28 pacientes receptores de trasplante cardíaco y observaron una disminución significativa de la creatinina en los trasplantados tratados con I/C. Tres de los diez pacientes del grupo placebo precisaron hemofiltración y dos de ellos hemodiálisis, mientras que ningún paciente del grupo I/C lo necesitó. Este estudio demostró que la administración de cilastatina, puede contrarrestar de manera eficaz la nefrotoxicidad inducida por CsA tras un trasplante cardíaco <sup>105</sup>.

Bagahie realizó un estudio en 20 pacientes trasplantados de corazón y pulmón tratados con CsA como inmunosupresor. Un grupo de 10 pacientes fueron tratados con I/C y otro con un agente antimicrobiano distinto. Los grupo de I/C presentó niveles de creatinina en suero inferiores al compararlos con el otro grupo <sup>9</sup>.

Gruss realizó un estudio retrospectivo sobre 104 pacientes para valorar los factores de riesgo de fallo renal asociados al trasplante de médula ósea inmunosuprimido con CsA. Encontró un efecto protector significativo asociado al uso de I/C con una disminución significativa de FRA; 13 de los 64 pacientes tratados con I/C desarrollaron FRA frente a 19 de 40 pacientes no tratados (20.3% vs. 47.5%)<sup>66</sup>.

Finalmente, Carmellini en 1997 realizó un estudio aleatorizado sobre 79 trasplantes renales con CsA, tratando a 33 con I/C y observando un efecto protector de I/C frente a la nefrotoxicidad inducida por CsA <sup>27</sup>.

Mraz <sup>114,115</sup> sugirió que el efecto nefroprotector de cilastatina se debía a la reducción de las concentraciones de CsA, pero Markewitz, Sido y Hammer no hallaron diferencias en dosis, niveles sanguíneos y metabolitos de CsA. Gruss observó que los niveles de CsA de pacientes tratados con I/C eran menores a los no tratados. Con todo, el efecto protector no se pudo atribuir a cambios en los niveles de CsA.

Desde 1997 no se ha publicado ningún otro trabajo clínico en relación con la interacción entre CsA e I/C. En 2006, nuestro grupo realizó una revisión crítica de la literatura, llevando a cabo un metaanálisis sobre los cinco trabajos clínicos y los dos experimentales previamente mencionados. El resultado del metaanálisis mostraba que I/C reducía en un 43% los niveles de creatinina sérica elevados por CsA, y en un 76% el riesgo de desarrollar FRA por CsA <sup>159</sup>.

### **3.3.2.- Interacción con Vancomicina**

Entre 1996 y 1998, la consideración de que cilastatina impedía el metabolismo renal de imipenem llevó a estudiar si podía reducir también el metabolismo renal de otro nefrotóxico, la vancomicina. En 1996, Toyoguchi mostró que antibióticos como la fosfomicina o el I/C podían reducir la nefrotoxicidad de vancomicina en conejos inhibiendo la acumulación renal de la misma <sup>162</sup>. En 1997 mostró que cilastatina sola aceleraba la eliminación de vancomicina, reduciendo sus niveles en plasma y en tejido renal y reduciendo o eliminando de modo dosis-dependiente el efecto nefrotóxico en conejos <sup>163</sup>. Kusama confirmó en ratas la reducción de la toxicidad renal de vancomicina por cilastatina, mostrando que ésta última aumentaba el aclaramiento metabólico de vancomicina, y reducía la cantidad acumulada en el tejido renal <sup>94</sup>. Propuso que cilastatina competía con vancomicina por una vía de entrada a las CTP. Sus estudios fueron ampliados por Nakamura, que mostró que I/C y fosfomicina podían reducir la nefrotoxicidad de vancomicina, aunque no concluyó si se trataba de una competición con la reabsorción o con la secreción tubular de la misma <sup>117</sup>.

### **3.3.3.- Interacción con Cisplatino**

Nakamura, también demostró la nefroprotección por I/C frente a la agresión renal producida por cisplatino <sup>117</sup>.

### **III.- *HIPÓTESIS***

---

## **HIPÓTESIS I:**

Cilastatina es capaz de reducir la toxicidad de un amplio abanico de fármacos nefrotóxicos tanto *in vitro* (cultivos de células epiteliales del túbulo proximal), como *in vivo* (modelos animales de toxicidad renal experimental).

## **HIPÓTESIS II:**

Debido a que cilastatina es un ligando de la dehidropeptidasa I localizada en las balsas de colesterol en el borde en cepillo de las células del túbulo proximal, la protección llevada a cabo por cilastatina tendría lugar por interferencia con el transporte y acumulación intracelular de los nefrotóxicos estudiados, que usarían preferiblemente dichas balsas como sistema de transporte natural en el túbulo.

## **IV.- OBJETIVOS**

---

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de esta tesis es estudiar el efecto nefroprotector de cilastatina contra la toxicidad renal producida por varios fármacos de uso común en clínica y conocer los mecanismos celulares y moleculares por los que reduce la inducción de dicha toxicidad. Este objetivo genérico se desglosa en varios objetivos concretos:

## **OBJETIVOS CONCRETOS**

- ✓ Demostrar experimentalmente que cilastatina no tiene ningún efecto nocivo sobre las células epiteliales del túbulo proximal renal en modelos *in vitro*.
- ✓ Comprobar experimentalmente en modelos *in vitro* si existe un efecto nefroprotector de cilastatina sobre la muerte celular, la lesión mitocondrial, la alteración de la viabilidad y la morfología celular, provocadas por los distintos tóxicos seleccionados.
- ✓ Investigar los mecanismos celulares por los que tiene lugar la nefroprotección, y relacionarlos con una posible interacción de cilastatina con el transporte de tóxicos al interior celular.
- ✓ Demostrar que el efecto nefroprotector de cilastatina es específico del túbulo proximal.
- ✓ Estudiar el efecto protector de cilastatina en un modelo experimental *in vivo*.



## ***V.- MATERIALES Y MÉTODOS***

***V.I.- MODELO IN VITRO:  
TOXICIDAD Y PROTECCIÓN***

---

## 1.- CULTIVOS CELULARES

### 1.1.- CÉLULAS RENALES

La mayor parte de los estudios experimentales *in vitro* fueron realizados en cultivos primarios de túbulos proximales obtenidos a partir de riñones de cerdos enanos de estirpe Maryland. Estos cerdos han sido seleccionados genéticamente para estudios de trasplantes de órganos y son homocigóticos para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad <sup>137</sup>. Los animales procedían de la granja especializada del Complejo Agropecuario de Aranjuez del Instituto Tecnológico de desarrollo Agrario (ITDA) de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid.

Los animales seleccionados para los estudios tenían una edad media de 3 meses y un peso medio de  $31,3 \pm 0,7$  kg, siendo indistintamente machos o hembras.

El manejo de los animales de experimentación utilizados se realizó siguiendo la normativa legal vigente (Real Decreto 1201/2005, del 10 de Octubre, 252/2005), con ayuda de personal cualificado y bajo la supervisión directa del veterinario responsable.

#### 1.1.1.- Aislamiento de túbulos proximales

Doce horas antes de la intervención, los cerdos se sometían a ayuno con agua *ad libitum*. El animal era premedicado 15 minutos antes de la cirugía con ketamina 10 mg/kg peso y atropina 0.025 mg/kg i.m., anestesiado con una dosis de inducción de propofol 10 mg/kg i.v. e intubado. La anestesia durante la cirugía se mantenía con peróxido de nitrógeno/oxígeno (4 l/min NO<sub>2</sub> y 2 l/min O<sub>2</sub>), propofol (Diprivan®) 15 mg/kg/h, fentanilo (Fentanest®) 0.75 mg/20min y bromuro de pancuronio (Pavulon®) 2 mg/20 min. Tras la intervención el animal se sacrificaba con sobredosis anestésica y KCl.

El riñón se extraía en quirófano bajo condiciones de esterilidad mediante nefrectomía simple bilateral por vía transperitoneal. Una vez extraído, era sumergido inmediatamente en HAM'S F12 (Bio-Whittaker Verviers, Bélgica) a 4°C con penicilina (100U/ml) / estreptomycin (100µg/ml) (Bio-Whittaker).

Bajo una campana de flujo laminar (Gelaire Flor laboratorios, modelo BSB 3A), el riñón se decapsulaba y se separaba la médula de la corteza. Ésta era cortada en láminas finas con ayuda de un microtomo Steadie-Riggs (Thomas Scientific, U.S.A.). Las láminas eran incubadas con colagenasa A (Sigma, Missouri, U.S.A.) (30 mg/riñón) diluida en HAM'S F12 (50 ml/riñón, concentración final de colagenasa 0.6 mg/ml) durante 20 ó 30 minutos en agitación a 37°C, equilibradas con carbógeno a saturación. La digestión se paraba con HAM'S F12 frío. El producto digerido era filtrado a través de una malla metálica de 250 µm (Endecotts LTD) y lavado tres veces con HAM'S F12 en una centrifuga (Eppendorf 5417 C) a 400 g durante 2 minutos. El sedimento final presenta una pureza del 80% de túbulos proximales.

Para aumentar la pureza y eliminar contaminantes, el sedimento se sometía a un gradiente de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suiza) isotónico al 45% en tampón Krebs-bicarbonato (NaCl 112 mM, KCl 3.3 mM,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  7  $\text{H}_2\text{O}$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM, 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) centrifugándose a 20000 g a 4°C durante 30 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Rotor SS-34), generándose un gradiente de densidad en el que se separan las diferentes fracciones de la nefrona cortical (Fig. 6). En la cuarta banda se encuentran los túbulos proximales con una pureza superior al 98%. Esta banda era recogida con pipeta Pasteur estéril y lavada 3 veces con HAM'S F12 frío a 400 g para eliminar los restos de Percoll. Para conocer el rendimiento se pesaba el sedimento resultante del último lavado.



**FIGURA 6. Aislamiento de túbulos proximales.** Gradiente de Percoll isotónico al 45% obtenido tras la centrifugación in situ a 20000 g durante 30 minutos a 4°C. El tubo de la izquierda contiene marcadores de densidad. En el tubo de la derecha se ha cargado la corteza de un riñón digerida con collagenasa. La fracción 1 contiene glomérulos, 2 y 3 túbulos distales de distinta longitud y 4 túbulos proximales con una pureza del 98%. A la derecha, túbulos proximales obtenidos en la fracción 4.

### **1.1.2.- Cultivo primario de células del túbulo proximal**

Los túbulos proximales obtenidos, eran resuspendidos a una concentración final de 0.66 mg/ml en un medio de cultivo compuesto de HAM'S F12:DMEM en proporción 1:1 y suplementado con hepes 25 mM (Bio-Whittaker), glutamina 2.5 mM (Bio-Whittaker), aminoácidos no esenciales 1% (Bio-Whittaker), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Bio-Whittaker), suero bovino fetal (SBF) 2% (Sigma), bicarbonato sódico 20 mM (Merck), hidrocortisona  $5 \cdot 10^{-8}$  M (Sigma), insulina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , transferrina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y selenio 5 ng/ml (Sigma). Finalmente se repartían 5 ml de la suspensión en placas de cultivo de 60 mm de diámetro con una superficie tratada para una óptima adherencia celular (Corning, Nueva York, U.S.A.). Las placas se mantenían en un incubador (Heraeus) a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Hasta el cuarto día no se realizó el primer cambio de medio para permitir la adhesión de las CTP. A partir del cuarto día, el medio de cultivo se renovaba cada 2-3 días. Las células alcanzaban la confluencia entre 8-10 días y comenzaban a presentar senescencia a los 12-13 días.

### ***1.1.3.- Cultivo secundario de células del túbulo proximal***

Las células que no eran utilizadas de inmediato eran congeladas. Cuando llegaban a confluencia, se retiraba el medio de cultivo y se lavaban con PBS-EDTA. Se retiraba éste y se añadía 1 ml de tripsina por placa de 60 mm. Se dejaba actuar la tripsina hasta que las células comenzaban a desprenderse (1-2 minutos). Se recogían en medio de cultivo y se lavaban a 400 g durante 2 minutos. Por cada grupo de tres placas de 60 mm, se añadía al sedimento 1,5 ml de SBF repartiéndose en viales de congelación con dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma) al 10% para preservar las estructuras celulares. Las CTP eran congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido.

El proceso de descongelación de las células se llevaba a cabo pasando el vial de congelación directamente del nitrógeno líquido a un baño a 37°C. Cuando el contenido empezaba a descongelarse, se diluía en medio de cultivo y se centrifugaba a 400 g durante 2 minutos para eliminar el DMSO. El sedimento resultante tras la centrifugación se diluía en medio de cultivo (1 vial/100 ml) y se sembraba en placas.

## **1.2.- CÉLULAS NO RENALES**

### ***1.2.1.- Células HeLa***

Línea celular establecida de cáncer de útero. Las células fueron cedidas amablemente por el laboratorio de la Dra. Carmela Calés del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el laboratorio del Dr. Fernando Valdivieso del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

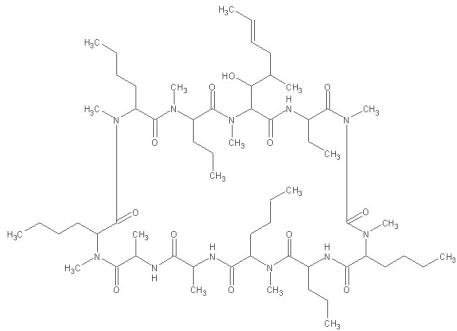
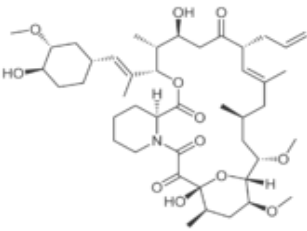
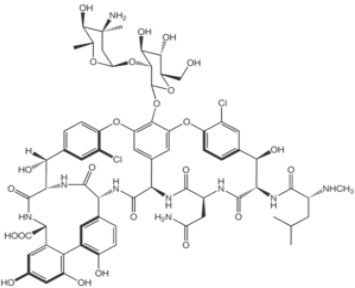
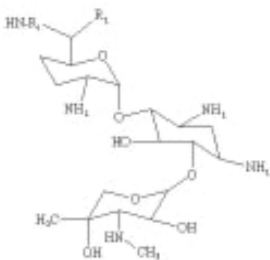
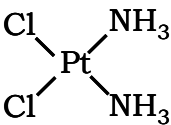
### ***1.2.2.- Linfocitos CD3+***

Se utilizaron linfocitos CD3+ de donantes sanos previo consentimiento informado, aislados de sangre periférica y separados por inmunomagnetismo (muestras celulares cortesía del servicio de Trasplante de Médula Ósea, Dr. Buño). La muestra se centrifugó a 120 g y fue resuspendida en 750 µl de medio RPMI (Bio-Whittaker) (en ausencia de SBF) para cuantificar el número de células de las que se disponía mediante Trypan Blue. Se utilizaron 600.000 células por determinación.

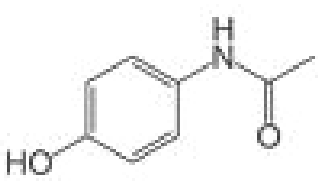
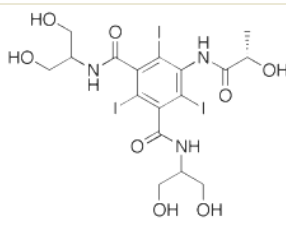
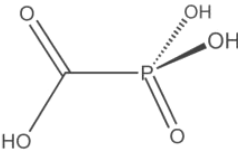
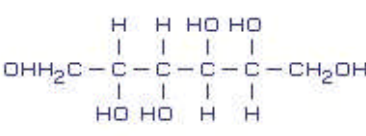
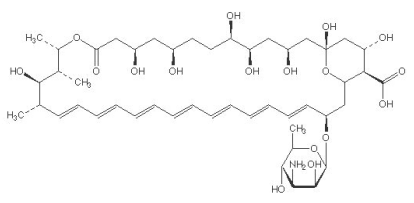
## 2.- FÁRMACOS EN ESTUDIO

Los fármacos seleccionados (los tóxicos y el agente nefroprotector cilastatina) se presentan en las siguientes tablas. Puede observarse como los tóxicos son compuestos con distinta naturaleza química y con acciones y dianas moleculares diferentes.

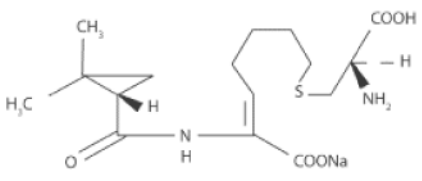
**TABLA 3. Fórmula y actividad de los fármacos nefrotóxicos estudiados.**

TÓXICOS	FÓRMULA QUÍMICA	DESCRIPCIÓN
CsA		<p>Endecapéptido cíclico que corresponde a la fórmula química <math>C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}</math> y peso molecular 1202.16 Da. Se utiliza como inmunosupresor.</p> <p>Adquirido a Sandoz (Novartis), Sandimmun (solución inyectable).</p>
Tacrolimus		<p>Macrólido cuya fórmula empírica en su configuración monohidratada es <math>C_{44}H_{69}NO_{12}</math>, y su peso molecular es 822 Da. Se utiliza como inmunosupresor.</p> <p>Adquirido a Astellas, Prograf, (solución inyectable).</p>
Vancomicina		<p>Antibiótico glicopeptídico de estructura compleja. Su fórmula empírica es <math>C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}</math> y su peso molecular 1485.7 Da.</p> <p>Adquirido a Combino Pharm (polvo).</p>
Gentamicina		<p>Antibiótico aminoglucósido de fórmula <math>C_{12}H_{43}N_5O_7</math> y peso molecular 449.5 Da.</p> <p>Adquirido a Guinama (polvo).</p>
Cisplatino		<p>Quimioterapéutico que contiene platino (diaminodicloroplatino (trans)). Fórmula: <math>Pt(NH_3)_2Cl_2</math> y peso molecular de 300 Da.</p> <p>Adquirido a Pharmacia (solución inyectable).</p>

**TABLA 3 (Continuación). Fórmula y actividad de los fármacos nefrotóxicos estudiados.**

TÓXICOS	FÓRMULA QUÍMICA	DESCRIPCIÓN
Paracetamol		Analgésico antipirético derivado de la acetanilida, de fórmula empírica $C_8H_9NO_2$ y peso molecular 151.16 Da.  Adquirido a Bristol-Myers Squibb, <i>Perfalgan</i> , (solución inyectable).
Contraste yodado (Iopamiro)		Utilizado para diagnóstico. Radiocontraste yodado no iónico (Iopamiro). Fórmula empírica: $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$ y peso molecular de 777.09 Da.  Adquirido a Rovi, <i>Iopamiro</i> , (solución inyectable).
Foscarnet		Antiretroviral. Análogo del pirofosfato.  Adquirido a AstraZeneca, <i>Foscavir</i> , (solución inyectable).
Osmofundina		Derivado alcohólico del azúcar, de fórmula $C_6H_{14}O_6$ y peso molecular 182.17 Da. Se utiliza como diurético osmótico.  Adquirido a Braun, Manitol 20%, (solución inyectable).
Fungizona		Antifúngico macrólido, de fórmula empírica $C_{47}H_{73}NO_{17}$ y peso molecular 924.08 Da.  Adquirido de Bristol, <i>Anfotericina B</i> , (polvo).
Cloroformo	$CHCl_3$	Compuesto tóxico que puede penetrar en el cuerpo por inhalación, ingestión o atravesando la piel. Fórmula química, $CHCl_3$ y un peso molecular de 119.38 g/mol.  Adquirido a Scharlau, (solución líquida).

**TABLA 4. Fórmula y actividad del compuesto nefroprotector estudiado.**

PROTECTOR	FÓRMULA QUÍMICA	DESCRIPCIÓN
Cilastatina		Sal monosódica del ácido [R-[R*,S*-(Z)]]-7-[(2-amino-2-carboxietil) tio]-2-[[[(2,2-dimetilciclopropil) carbonil] amino]-2-heptenoico. Su fórmula empírica es $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$ , y tiene un peso molecular de 380.44 Da. 44.  Amablemente cedida por MSD.

## 2.1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS

Dentro del grupo seleccionado de nefrotóxicos, se encuentran tanto compuestos polares como apolares, catiónicos o neutros, liposolubles e hidrosolubles. En las siguientes tablas (Tablas 5 y 6), pueden observarse las características químicas de solubilidad y acidez/basicidad de los tóxicos y del nefroprotector a estudiar.

**TABLA 5. Características químicas de los tóxicos seleccionados.**

TÓXICO	ACIDEZ/BASICIDAD	SOLUBILIDAD EN MEDIOS ORGÁNICOS	SOLUBILIDAD EN AGUA
CsA	apolar	alta	baja
Tacrolimus	apolar	alta	insoluble
Vancomicina	anfótero	-	alta
Gentamicina	neutra	soluble en DMF insoluble en solutos orgánicos	soluble en agua
Cisplatino	neutro	DMF ( 9.7 mg/kg )	0.253g / 100 g
Paracetamol	neutro	soluble en etanol y acetona insoluble en suero	moderadamente soluble en agua caliente
Contraste iodado (iopamiro)	aniónico	soluble en metanol insoluble en cloroformo	soluble en agua
Foscarnet	aniónico	insoluble	soluble en agua
Manitol	aniónico	soluble en glicerol insoluble en éter	soluble en agua (1g/ 5.5 ml)
Anfotericina B	aniónico	soluble en DMF (2 a 4mg/ml), DMF+HCl (70 mg/ml) DMSO (30- 40mg/ml)	soluble en agua a pH 2 o a pH 11 (0.1 mg/ml)
Cloroformo	apolar	soluble	miscible en agua

**TABLA 6. Características químicas del nefroprotector seleccionado.**

PROTECTOR	ACIDEZ/BASICIDAD	SOLUBILIDAD EN MEDIOS ORGÁNICOS	SOLUBILIDAD EN AGUA
Cilastatina	neutro	-	muy soluble



Las dosis utilizadas en los diferentes experimentos se seleccionaron mediante ensayos previos realizados en nuestro laboratorio utilizando dosis-respuestas. En algunos casos se han utilizado concentraciones puntuales de los mismos, empleando las concentraciones alcanzadas habitualmente en plasma durante la práctica clínica.

Todos los nefrotóxicos utilizados han sido suministrados por la Unidad de Farmacia del Hospital (ver proveedores en la tabla 2 columna “descripción”) (Tabla 7).

**TABLA 7. Concentraciones *in vitro* utilizadas de los distintos nefrotóxicos y del nefroprotector.**

TÓXICO	CONCENTRACIONES	TÓXICO	CONCENTRACIONES
CsA	0.01 - 100 µg/ml	C. IODADO	1 mg/ml
TACROLIMUS	5 - 500 ng/ml	FOSCARNET	1 mM
VANCOMICINA	0.6 - 25 mg/ml	MANITOL	100 mosm/l
GENTAMICINA	10 - 30 mg/ml	ANFOTERICINA	10 µg/ml
CISPLATINO	1- 30 µM	CLOROFORMO	100 µg/ml
PARACETAMOL	30 - 3000 µg/ml		

PROTECTOR	CONCENTRACIONES
CILASTATINA	50 - 1000 µg/ml

La concentración de cilastatina que se utilizó en la mayoría de los experimentos *in vitro* realizados fue 200 µg/ml, ya que es la concentración más alta alcanzada en humanos (Tabla 8).

**TABLA 8. Concentraciones de cilastatina alcanzadas en plasma en función de la dosis utilizada.**

	*					
DOSIS (mg/kg)	5	10	20	50	100	200
[CILASTATINA] PLASMA (µg/ml)	22	65	100	250	600	1000

\* Rango de dosis usado en clínica humana.

### **3.- ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR**

#### **3.1.- MORFOLOGÍA**

Se utilizó un microscopio invertido IX70 (Olimpus) con platina termostatzada a 37°C (Magapor), y videomicroscopía acoplada a un ordenador con aumento de 20X ó 40X. Las imágenes se obtuvieron en los días señalados en cada experimento y las células se devolvieron al incubador para continuar su dinámica de crecimiento.

En todos los casos se utilizaron como control cultivos celulares sin tratamiento.

#### **3.2.- CITOMETRÍA**

##### **3.2.1.- Videomicroscopía**

Las CTP se cultivaron en placas de 60 mm un periodo máximo de 15 días.

El conteje de las células en cultivo se realizó *in situ* sobre imágenes de la monocapa celular obtenidas en un microscopio con aumento de 40X, calibrado mediante una rejilla de Neubauer y correspondiente a 0,0775 mm<sup>2</sup>. Las imágenes fueron adquiridas mediante un sistema de videomicroscopía (cámara COHU acoplada a un ordenador a través de una tarjeta grabadora de video VG-5 con chip de integración) que permite la grabación rápida de imágenes, de forma que las células eran devueltas al incubador tras un corto periodo de tiempo. Las imágenes se analizaron mediante el programa "Scion image" (Scion Corporation, 1998), basado en el programa Image de McIntosh del Nacional Institute of Health, U.S.A.

En cada cultivo, cada tratamiento en estudio se aplicó a un mínimo de seis placas. A cada placa se le asignó un número y fue dividida en siete sectores, seis periféricos y uno central. Para la toma de imágenes a los tiempos especificados, las placas eran elegidas mediante una tabla de números aleatorios (Epiinfo). Se elegían tres placas del tratamiento correspondiente en cada sector. El valor medio de los 21 contejes se consideró el valor de  $n = 1$  para el día y tratamiento en cuestión. El "n" representa el número de animales estudiados para cada condición, y las medidas de variación se corresponden con los errores de las medias entre animales para la condición estudiada.

##### **3.2.2.- Citometría de flujo**

El conteje de células mediante citometría de flujo se realizó sobre cultivos semiconfluentes de CTP tratados durante 24 horas con los tratamientos correspondientes. Las células y restos celulares desprendidos al medio de cultivo fueron fijados y permeabilizados en etanol al 70% y almacenados a -20° C. Tras retirar el etanol, las células fueron lavadas dos veces en PBS. Posteriormente, se incubaron con PBS-EDTA, ioduro de propídio (IP) 40 µg/ml y ARNasa 250 µg/ml durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. El conteje se realizó en un citómetro FACScan con un láser simple de ión argón. Se fijaron ventanas en base a las

características de FSC (tamaño), SSC (complejidad), FL2-H (altura), FL2-A (área) y FL2-W (anchura). Las dos últimas se utilizaron para descartar los dobletes celulares. Los datos obtenidos se analizaron con el software WinMDI.

### **3.3.- FRAGMENTACIÓN DEL ADN**

#### **3.3.1.- Actividad endonucleasa**

La fragmentación internucleosomal del ADN fue analizada mediante geles de agarosa. Las CTP se sembraron en placas de 100 mm de diámetro hasta semiconfluencia y se incubaron durante 24 horas con los tratamientos correspondientes. Se utilizó camptotecina (50 µg/ml) como control positivo de apoptosis. Se recogieron las células por tripsinización y se centrifugaron dos veces en PBS frío a 400 g, 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se añadió al sedimento 20 µl de buffer de lisis (EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, Laurilsarkosil sódico 0.5% (p/v)). Éste se incubó durante 30 minutos en hielo y se centrifugó a 12000 g, 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante (ADN de bajo peso molecular) se incubó 1 hora a 50°C con proteinasa K (0.2 µg/µl). Se añadió ARNasa A (1 µg/µl) y se mantuvo la incubación 1 h a 50°C. Finalizado este periodo de incubación, se añadieron 20 µl de tampón de carga caliente (agarosa de baja temperatura de fusión 1% (p/v), 40% (p/v) de sacarosa y 0.25 % (p/v) de azul de bromofenol) y se incubó durante 10 minutos a 70°C. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa (Pronadisa, Madrid, España) al 1.5% con 1 µg/ml de bromuro de etidio (Promega Corporation, Madison, USA) en TAE. Se corrió el gel a 100 V durante 1 h a 4°C. El resultado fue visualizado con luz ultravioleta y fotografiado. La actividad endonucleasa se identificó mediante la observación de bandas de ADN de bajo peso molecular.

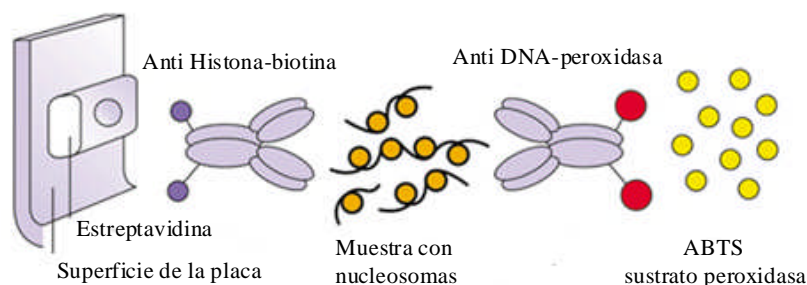
#### **3.3.2.- Enriquecimiento nucleosomal**

Se determinó la fragmentación del ADN inducida por los fármacos en presencia y ausencia de cilastatina en CTP en cultivo, al cuantificar el enriquecimiento nucleosomal.

Para ello se utilizó un kit de ELISA (Boehringer-Mannheim, Roche, Mannheim, Alemania) de muerte celular que determina los fragmentos de ADN mediante anticuerpos anti histona-biotina y anti ADN-peroxidasa.

Las células fueron cultivadas hasta semiconfluencia en placas de 24 pocillos de 16 mm de diámetro y tras los tratamientos correspondientes durante 48 horas, se lisaron con 200 µl de solución de lisis durante 30 minutos a temperatura ambiente. El lisado se recogió y se centrifugó a 200 g durante 10 minutos. Del sobrenadante resultante (fracción citosólica), se añadieron 20 µl por pocillo. A continuación se añadió una mezcla de anticuerpos anti histona-biotina (que reconoce la estreptavidina con la que está tratado el fondo de la placa y las proteínas histonas del ADN) y anti ADN-peroxidasa (que reconoce el ADN, llevando a cabo por peroxidasa la reacción

colorimétrica que nos permite la cuantificación), incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo los pocillos fueron lavados. Se añadió ABTS (sustrato de la peroxidasa) y se determinó su actividad fotométricamente a 405 nm con un lector de ELISA (Anthos 2020). Se calculó la relación entre la actividad enzimática de una muestra incubada por un periodo de tiempo dado, y el correspondiente valor a tiempo 0 tras la activación (factor de enriquecimiento) (Fig. 7).



**FIGURA 7. Esquema general del procedimiento.**

### **3.4.- LIBERACIÓN DE CITOCROMO C**

El estudio de localización de citocromo C se determinó mediante fraccionamiento celular y western blot.

Las CTP fueron sembradas en placas de 100 mm de diámetro hasta semiconfluencia y sometidas a las dosis altas de los nefrotóxicos durante 24 horas. Las proteínas se extrajeron empleando 70  $\mu$ l del tampón de lisis (250 mM sacarosa, 80 mM KCl, 500  $\mu$ g/ml digitonina, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, inhibidores de proteasas, en PBS). Se incubaron 10 minutos a 4°C y posteriormente los lisados fueron centrifugados a 12000 g a 4°C durante 5 minutos para obtener los sobrenadantes (extractos citosólicos libres de mitocondrias) y los sedimentos (fracción que contiene las mitocondrias). Los sedimentos se resuspendieron en 90  $\mu$ l de buffer de lisis (250 mM sacarosa, 80 mM KCl, 500  $\mu$ g/ml digitonina). La concentración de proteínas de ambas fracciones celulares se determinó mediante la técnica de Bradford <sup>20</sup>.

A continuación, sobrenadantes (50  $\mu$ g) y sedimentos (50  $\mu$ g) se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15% en condiciones reductoras (ver apartado 9 “Estudio de proteínas: western blot”).

### **3.5.- ANEXINA-V**

Las células sometidas a los tratamientos correspondientes, durante los periodos de tiempo indicados, eran centrifugadas durante 6 minutos a 400 g. El precipitado se resuspendió en 100  $\mu$ l de buffer (10 mmol/l hepes, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mmol/l CaCl<sub>2</sub>) y 5  $\mu$ l de Anexina-V (Molecular Probes). Se incubó en oscuridad 10 minutos.

La intensidad de la fluorescencia verde de las células se cuantificó como el desplazamiento en la escala logarítmica con respecto al control (células creciendo en 10% SBF), frente al número de células analizadas, excluyendo los detritos celulares.

## **4.- ESTUDIOS DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL**

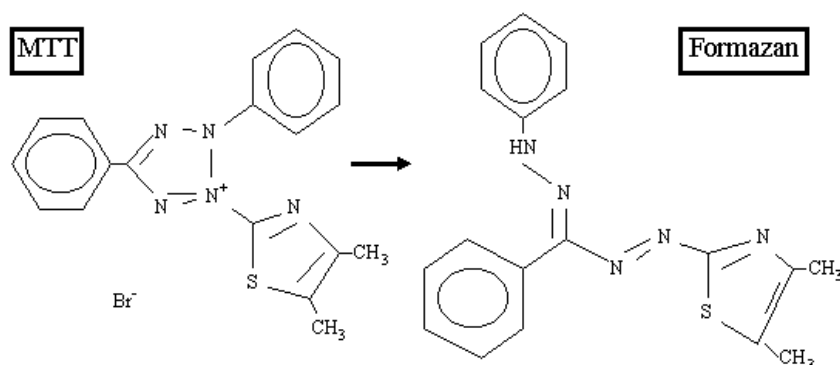
### **4.1.- POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

La depolarización de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se cuantificó usando el colorante mitocondrial JC-1 (200  $\mu$ M) (Molecular Probes, OR, USA) por citometría de flujo <sup>142</sup>. Este fluoróforo nos indica si existe depolarización de la membrana según 2 tipos de fluorescencia: fluorescencia verde (525 nm) (FL-1) y fluorescencia roja (590 nm) (FL2), ya que el fluoróforo tiene la propiedad de agregarse y penetrar en el espacio intermembranoso emitiendo fluorescencia roja cuando el potencial de membrana mitocondrial no está alterado. Si el potencial disminuye, el fluoróforo no accede al espacio intermembranoso permaneciendo en el citosol en forma monomérica (fluorescencia verde). Como controles positivos se utilizaron el CCCP (50 mM), agente que desacopla el potencial de membrana al actuar como ionóforo perforando la membrana mitocondrial y desencadenando la pérdida del potencial, y la camptotecina (50  $\mu$ g/ml), como compuesto que produce activación de la muerte celular por apoptosis. Los datos se representaron empleando el software WinMDI, mediante la medida en un citómetro FACScan de la fluorescencia verde ( $530 \pm 15$  nm) y roja ( $585 \pm 21$  nm) del JC-1. Se tuvieron en cuenta los primeros 10.000 eventos por muestra.

### **4.2.- MEDIDA DE LA TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA DE LA CADENA MITOCONDRIAL EN TIEMPO REAL**

La transferencia electrónica fue determinada por la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Calbiochem) a un compuesto coloreado de color azul (formazán), llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Fig. 8).

La reducción del MTT a tiempo real se determinó en CTP semiconfluentes sembradas en placas de 24 pocillos (16 mm de diámetro). Se substituyó el medio de cultivo por MTT 0.5 mg/ml de concentración final en PBS más el tratamiento con la dosis más alta del tóxico correspondiente en presencia y ausencia de cilastatina 200  $\mu$ g/ml. Esta reducción fue determinada midiendo la absorbancia a 595 nm, con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX70 acoplado a un fotomultiplicador controlado desde un fluorímetro SLM Aminco 2000. Primero se cuantificó la reducción del MTT a azul de formazán en células control, sin tratamiento. A continuación se realizó el mismo ensayo pero sometiendo a las células a los distintos tóxicos en ausencia y presencia de cilastatina desde el momento inicial de la determinación.



**FIGURA 8. Reacción de reducción del MTT a azul de formazán.**

#### 4.3.- MEDIDA DE LA CAPACIDAD OXIDATIVA CELULAR

Cuando en la técnica anterior se permite que la reacción progrese hasta agotar el sustrato, la cuantificación del producto permite aproximar el porcentaje de células viables en una condición determinada.

Las células (CTP o HeLa) se sembraron en placas de 96 pocillos hasta semiconfluencia, y se sometieron a concentraciones crecientes de los nefrotóxicos en presencia y ausencia de cilastatina 200 µg/ml durante 24 horas y 48 horas. Posteriormente, se añadió el MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml y se incubó 3 horas a 37°C en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 100 µl de buffer de lisis (20% SDS en 50% N,N-dimetilformamida, pH 4.7) y la placa se incubó toda la noche a 37°C en oscuridad. Finalmente, se cuantificó la absorbancia a 595 nm.

El porcentaje de viabilidad es igual a:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas} \times 100}{\text{DO células control}}$$

DO: Densidad óptica.

## **5.- ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR**

### **5.1.- IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro hasta semiconfluencia y fueron tratadas durante 24 horas con los tóxicos correspondientes en cada caso en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml). A continuación, las células se levantaron con tripsina y se lavaron con suero salino estéril para eliminar los restos de los estímulos, centrifugando 2 minutos a 400 g. Las células se resembraron en placas petri de 100 mm con medio al 10% SBF dejándose crecer durante 7-10 días. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo de las placas, se fijaron durante 5 minutos con paraformaldehído al 5% en PBS y se tiñeron durante 2 minutos con violeta cristal (0.5 % violeta cristal en 20 % de metanol, Sigma). Una vez teñidas las células, se lavaron 2 veces con PBS y se fotografiaron. A continuación, el violeta cristal fue eluido con 2 ml de solución de elución (50% etanol y 50% citrato sódico 0.1M, pH 4.2) y se cuantificó su absorbancia a 595 nm.

## **6.- DINÁMICA DE BALSAS DE COLESTEROL**

Para identificar las BDC se utilizó toxina B colérica conjugada con un fluorólogo (FICT) (Molecular Probes, USA) que utiliza dichas balsas para su internalización celular. Se utilizó como control negativo un agente modificador de las BDC, filipina.

Las CTP fueron cultivadas en cubreobjetos de cristal hasta semiconfluencia. Las células fueron pre-incubadas con filipina (Sigma) (50 µg/ml), cilastatina (200 µg/ml) o exclusivamente con medio de cultivo (controles) durante 15 minutos. A continuación, fueron incubadas a diferentes tiempos (1 hora y 2.5 horas) con los mismos tratamientos anteriores en presencia de toxina B colérica-FITC (10 µg/ml). Finalizados los distintos tiempos de incubación, las células fueron lavadas con PBS y teñidas con DAPI (5 µg/ml) durante 2 minutos. Posteriormente, fueron fijadas en formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se montaron sobre portaobjetos en posición invertida con una gota de medio de montaje (DAKO) y fueron observadas al microscopio confocal.

## **7.- ESTUDIOS DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE FÁRMACOS**

Los cultivos primarios subconfluentes de CTP fueron sometidos a dosis crecientes de todos los tóxicos en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml) durante 24 horas. Tras la incubación, se añadió a la monocapa 400 µl de buffer de lisis a 70°C (2.22 % (p/v) SDS; 19.33 % (v/v) Glicerol (87% v/v); 790 mM Tris HCl pH 6.8, 50 ml) por placa de 100 mm de diámetro. Se levantaron las células y se recogió el volumen final obtenido. Éste se sometió a choque térmico, calentándose primeramente durante 5 minutos a 100°C y pasándolo a continuación a hielo. Cada muestra se sometió a descompresión brusca, y se centrifugaron a 12000 g durante 5 minutos. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes y se desecharon los precipitados. La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford <sup>20</sup>. Las muestras se almacenaron a - 20°C.

La determinación de la concentración intracelular de los tóxicos CsA, tacrolimus, gentamicina, vancomicina y paracetamol se realizó mediante inmunoanálisis de polarización de fluorescencia (TDX) (ABBOTT Laboratories, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La concentración intracelular de cisplatino se determinó por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (cuadrupolo ICP-MS, Thermo X-Series, Thermo Electron, Windsford, Cheshire, U.K.) monitorizando las señales masa/carga (m/z) de los isótopos <sup>194</sup>Pt, <sup>195</sup>Pt e <sup>191</sup>Ir.

## **8.- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE CISPLATINO POR SEC-ICP-MS**

Extractos celulares obtenidos de cultivos tratados 24 horas con cisplatino (10 µM) con y sin cilastatina (200µg/ml) (mismo procedimiento de obtención que en el punto anterior) fueron descongelados y centrifugados a 15000 g durante 40 minutos a 4°C para la obtención de los sobrenadantes a utilizar (fracción citosólica). Éstos fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0.22 µm y sometidos a cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Para ello se introdujeron 100 µL de cada muestra en una columna cromatográfica Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia, Amersham, Uppsala, Sweden) acoplada al ICP-MS, utilizándose como fase móvil Tris-NO<sub>3</sub> 10 mM, NaCl 25 mM (pH 7.4) a un caudal de 0.8 ml/min. Las diferentes especies del cisplatino fueron obtenidas por la monitorización por ICP-MS del valor masa/carga (m/z) del isótopo <sup>195</sup>Pt <sup>48</sup>.

El patrón y tiempo de retención de las especies iónicas comunes del cisplatino fueron obtenidos mediante cinéticas de reacción de cisplatino en Tris-NO<sub>3</sub> 10 mM, NaCl 4.62 mM (pH 7.4) a 0 y 4 horas respectivamente.



## **9.- ESTUDIOS DE PROTEÍNAS: WESTERN BLOT**

Las fracciones proteicas correspondientes, se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15% en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en 25 mM Tris, pH 8.8, 150 mM glicina y 20% (v/v) metanol. Las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en polvo en PBS Tween 0.1% durante 1h a temperatura ambiente y se incubaron durante 18 horas a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios en 5% leche PBS Tween 0.1%:

- ✓ Anticuerpo policlonal anti-citocromo C en cabra, dilución (1/500). *Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA)*.

- ✓ Anticuerpo policlonal anti-VDAC en cabra, diluido (1/500). *Santa Cruz Biotechnology*.

- ✓ Anticuerpo monoclonal anti-tubulina en ratón, diluido (1/10000). *Sigma*, clone B-512.

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa: anticuerpo anti-ratón IgG, dilución (1/10000) de *Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra)* y anticuerpo anti-cabra IgG, dilución (1/5000) de *Santa Cruz Biotechnology*.

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se identificó la proteína mediante quimioluminiscencia (ECL, *Amersham*).

***V.II.- MODELO IN VIVO:  
TOXICIDAD Y PROTECCIÓN***

---

## **1.- MODELO DE FRA POR CISPLATINO**

Se realizó un modelo experimental animal *in vivo* de toxicidad renal generada por el quimioterápico cisplatino, en presencia del nefroprotector cilastatina. Para ello se utilizaron ratas Wistar (WKY) macho de un peso medio de  $260 \pm 15$  g, y una edad media de 7-8 semanas, criadas y estabuladas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Dos semanas antes de comenzar el modelo experimental, se pesaron los animales, se identificaron mediante numeración y se separaron en distintas jaulas en función de los grupos a estudiar. Para conocer su evolución, los animales fueron observados y pesados en varias ocasiones antes de comenzar el estudio.

Toda la manipulación de los animales se llevó a cabo según la normativa legal vigente recogida en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, bajo la supervisión directa del veterinario responsable.

### **1.1.- DISEÑO DEL MODELO ANIMAL**

Se utilizaron en total 28 animales que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos con un tamaño muestral  $n=6-8$  animales por grupo (establecido por revisión bibliográfica). Así pues, los grupos de estudio y sus regímenes de tratamiento fueron los siguientes:

✓ **Grupo cisplatino + cilastatina (n=8):** animales tratados con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso) disuelto en suero salino (vehículo del cisplatino), más cilastatina disuelta en suero salino (vehículo de cilastatina) a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas intraperitonealmente desde el momento de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio.

✓ **Grupo cisplatino (n=8):** animales con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso) disuelto en suero salino (vehículo del cisplatino), más el vehículo de la cilastatina (suero salino) cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina.

✓ **Grupo control + cilastatina (n=6):** animales tratados con administración única intraperitoneal de suero salino (vehículo del cisplatino) en el mismo volumen que los grupos tratados con cisplatino, más cilastatina (disuelta en suero salino) a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas intraperitonealmente desde el momento de administración del suero salino (vehículo del cisplatino) y hasta el momento del sacrificio.

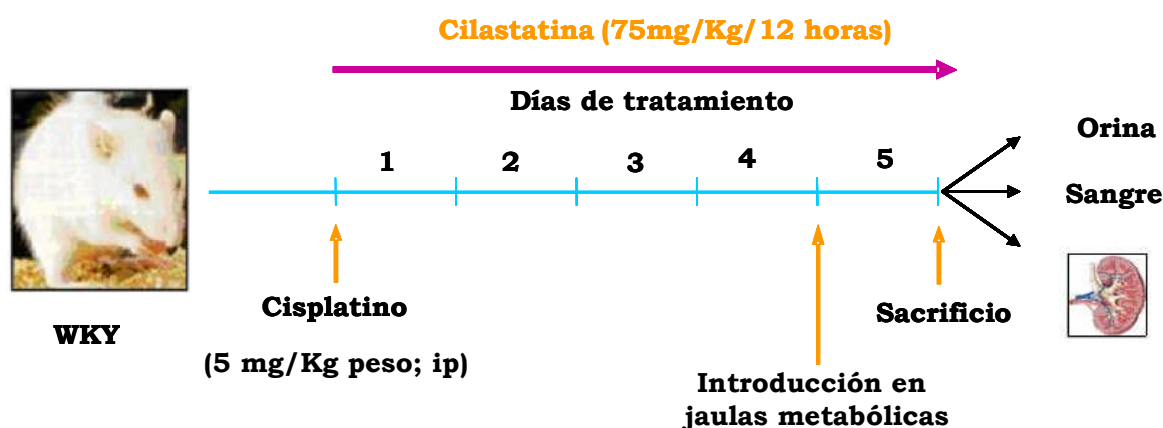
✓ **Grupo control (n=6):** animales tratados con suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que en los grupos tratados con cisplatino y/o cilastatina.

El resumen de los grupos y los tratamientos recibidos se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 9. Grupos del modelo experimental.** El vehículo de cisplatino y cilastatina es el mismo, suero salino fisiológico.

	CISPLATINO	CILASTATINA	VEHÍCULO CISPLATINO	VEHÍCULO CILASTATINA
CONTROL			X	X
CONTROL + CIL		X	X	X
CISPLATINO	X		X	X
CISPLATINO + CIL	X	X	X	X

Como puede observarse en la figura 9, el estudio duró 5 días a partir de la administración intraperitoneal del cisplatino (en los grupos cisplatino y cisplatino + cilastatina), o su vehículo suero salino (en los grupos control y control + cilastatina), coadministrándose a partir de ese momento y cada 12 horas cilastatina (en los grupos control + cilastatina y cisplatino + cilastatina), o su vehículo suero salino (a los grupos cisplatino y control). Durante todo el período, los animales tuvieron libre acceso tanto al agua como a la comida (dieta estándar) en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 horas con la finalidad de cuantificar la diuresis y la concentración de proteínas.



CONTROLES: WKY sin tratamiento de cisplatino ± cilastatina.

**FIGURA 9. Modelo experimental de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino.**

## **2.- EXTRACCIÓN, PROCESAMIENTO Y ALMACENAJE DE LAS MUESTRAS**

En el momento del sacrificio, los animales fueron pesados y posteriormente anestesiados con ketamina (10 mg/kg) y diazepam (4 mg/kg). Una vez anestesiados se les extrajo la sangre mediante canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. La sangre se incubó durante 30 minutos a 37°C, posteriormente 1 hora a 4°C y a continuación se centrifugó a 500 g 15 minutos a 4°C. Esto permitió la obtención de suero sanguíneo que fue almacenado a – 80°C hasta el momento de uso. Tras la exsanguinación se clampó la aorta cortando su flujo por encima de los riñones, se perforó la vena cava inferior y se perfundieron los riñones a través de la cánula con suero salino frío (Braun Medical S.A., Barcelona, España). Posteriormente los riñones fueron extraídos, decapsulados, pesados y mantenidos en suero salino frío durante su manipulación para minimizar la degradación del tejido.

Los riñones derechos se seccionaron transversalmente justo por encima de la arteria renal, obteniendo los polos renales superiores que fueron introducidos en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas para su fijación y posterior inclusión en parafina. El polo inferior de los riñones derechos, así como la totalidad de los riñones izquierdos fueron separados en corteza y médula, congelando ambas muestras en nitrógeno líquido, y almacenándolas a – 80°C hasta el momento de su utilización. También se obtuvieron muestras de corazón, hígado y aorta, que fueron convenientemente procesadas y almacenadas a – 80°C. Las muestras renales inmersas en paraformaldehído se fijaron durante 24 horas a 4°C. Posteriormente fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol e incluidas finalmente en parafina en el procesador de tejidos Histolab ZX (Especialidades Médicas MYR S.L., Tarragona, España). Las muestras parafinadas fueron cortadas en un microtomo HM 325 (Microm) en finas secciones de 4 µm de grosor que se montaron sobre portaobjetos pretratados con APES al 2% en acetona y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización en los estudios morfológicos y de inmunohistoquímica.

## **3.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO Y ORINA**

Los parámetros hemodinámicos y de función renal en suero y orina, se determinaron usando un autoanalizador Dimension RxL de Dade-Behring, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.- DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA**

La excreción de proteínas fue determinada en las orinas de los animales obtenidas tras la colocación de los mismos en jaulas metabólicas, durante las 24 horas anteriores al sacrificio. La proteinuria se determinó por el método del ácido sulfosalicílico <sup>67</sup>.

#### **5.- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS**

Secciones de tejido renal incluidas en parafina de 4 µm de grosor previamente desparafinadas e hidratadas, se tiñeron con hematoxilina-eosina (bio-Óptica, Milán, Italia), estudiándose la morfología por medio de microscopía óptica convencional.

## ***V.III.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

---

## **1.- MODELO *IN VITRO***

Las variables de interés estudiadas han sido todas cuantitativas continuas, y sus valores se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Todas las mediciones se han realizado por duplicado, y cada resultado presentado se ha obtenido en al menos tres preparaciones procedentes de animales diferentes. Cuando se presentan trazados singulares, resultados similares han sido obtenidos en al menos dos ocasiones más.

Los efectos de cilastatina sobre las variables modificadas por los fármacos nefrotóxicos sometidos a estudio, se han evaluado mediante ensayos factoriales de medias repetidas. Los resultados se han analizado mediante un modelo general de ANOVA de dos vías para medidas independientes. Los dos factores habituales en cada estudio han sido el “factor cilastatina”, con dos niveles (sí, no), y el factor “dosis del tóxico”, habitualmente con cuatro niveles correspondientes a las dosis (en tal caso, el ensayo se controlaba con una dosis de “0” en el primer nivel del factor). En los modelos mencionados se ha incluido siempre el factor interacción “cilastatina\*dosis del tóxico”, así como un análisis a posteriori de las diferencias entre niveles, utilizando el test LSD (“least significant difference”) como discriminante. Se ha usado un  $\alpha$  bilateral de 0.05 como índice de significación. Cuando se han encontrado diferencias significativas para el factor de protección por cilastatina, se ha procurado confirmar dicha diferencia mediante comparación de los ajustes no lineales de las dosis-respuesta correspondientes.

En el caso de datos extremos (“out layer”), se ha considerado como criterio de no inclusión la separación de la mediana por más de dos rangos intercuartílicos.

Para comparación de porcentajes se han utilizado tablas de 2 x n, y la significación se ha establecido mediante el test de  $\chi^2$  o la proporción exacta de Fisher si no se cumplían las condiciones para aplicar la primera.

## **2.- MODELO *IN VIVO***

Para calcular la igualdad de varianza entre los grupos se utilizó el test de Levene. Aquellas variables continuas que presentaban igualdad de varianza y una distribución que se ajustaba a la normal se analizaron mediante el test de ANOVA y en el caso contrario, con el de Kruskal-Wallis. Los resultados son expresados como media  $\pm$  error estándar de la media. Valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Todos los test estadísticos utilizados se realizaron con el programa informático SPSS.



## **VI.- *RESULTADOS***

---

## **VI.1.- *ESTUDIOS IN VITRO***

---

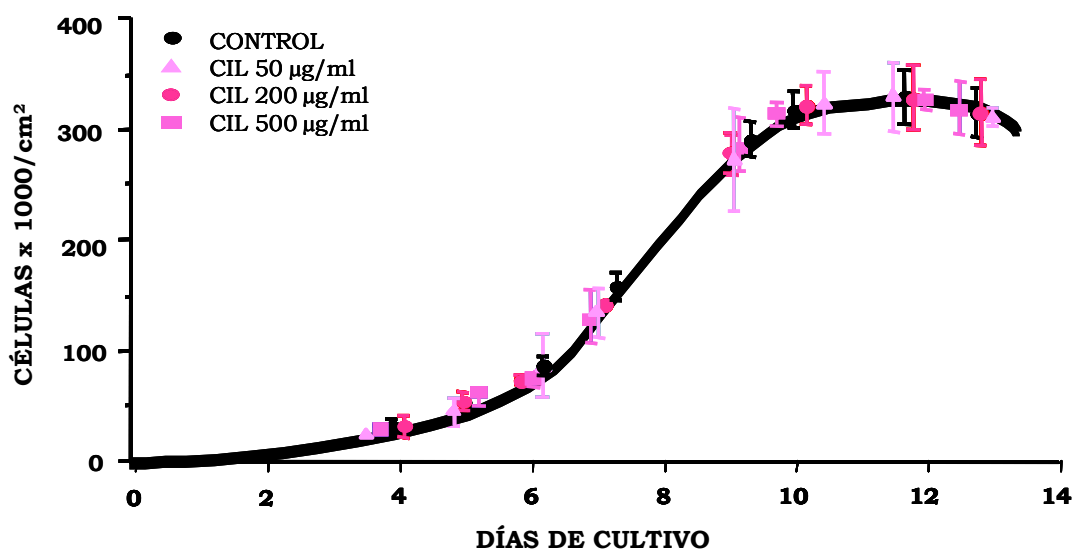
## 1.- NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA. BÚSQUEDA DE DOSIS. ESTUDIOS PRECLÍNICOS

Para la mayor parte de los estudios *in vitro*, se utilizaron cultivos primarios de CTP, ya que reproducen las condiciones de un túbulo renal recuperándose de una necrosis tubular aguda. Se ha utilizado este modelo para estudiar si cilastatina presenta algún efecto en dinámica de crecimiento, desprendimiento y confluencia celular, morfología de la monocapa, etc.

### 1.1.- DINÁMICA DE CRECIMIENTO CELULAR

Mediante la cuantificación *in situ* de las células en cultivo se determinó la dinámica de crecimiento de un cultivo de CTP, caracterizado por una primera fase de adhesión de las células a la placa de cultivo (2-3 días después de la siembra), seguida de una fase de crecimiento exponencial (días de 4-9), una fase estacionaria al alcanzar la confluencia (hasta el día 12) y finalmente una fase de senescencia.

En uno de los trabajos previos a su comercialización, se afirmó que cilastatina a dosis de 1g/kg/día podía producir descamación del endotelio tubular como manifestación de toxicidad renal <sup>138</sup>. Para comprobar si la administración de cilastatina presenta algún efecto nocivo sobre el epitelio tubular, se ensayó *in vitro* su acción en cultivos de CTP (Fig. 10), a concentraciones crecientes, empleando desde la dosis terapéutica, hasta la máxima alcanzada en sangre (Tabla 8).



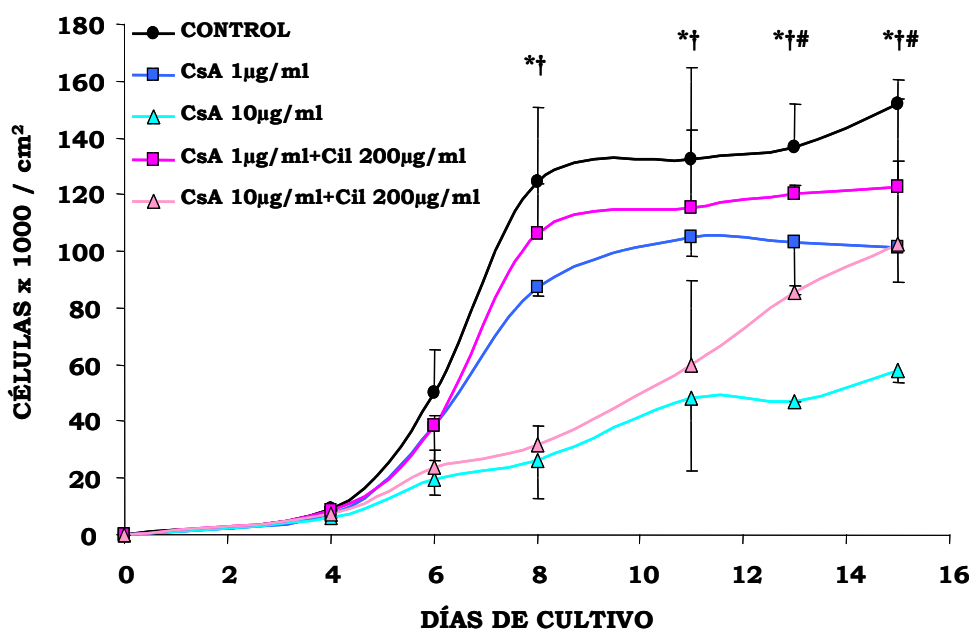
**FIGURA 10. Dinámica de crecimiento de los cultivos de células del túbulo proximal al incubarlos con distintas dosis de cilastatina.** Cilastatina no afectó al crecimiento celular. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM de células viables contadas por  $\text{cm}^2$ . La cuantificación celular se llevó a cabo en un microscopio invertido (contraste de fase, magnificación 40X).

Los incrementos en la concentración de cilastatina de 50 a 500  $\mu\text{g/ml}$ , no mostraron ningún efecto significativo sobre la dinámica de crecimiento de las CTP (Fig. 10). Esto significa que cilastatina no sólo no produce ningún efecto nocivo que ralentice o pare el crecimiento del cultivo, sino que además tampoco provoca activación del crecimiento celular, siendo por ello cilastatina un fármaco seguro, e inocuo para las CTP.

### 1.1.1.- Efecto de cilastatina sobre la dinámica de crecimiento celular en cultivos tratados con nefrotóxicos

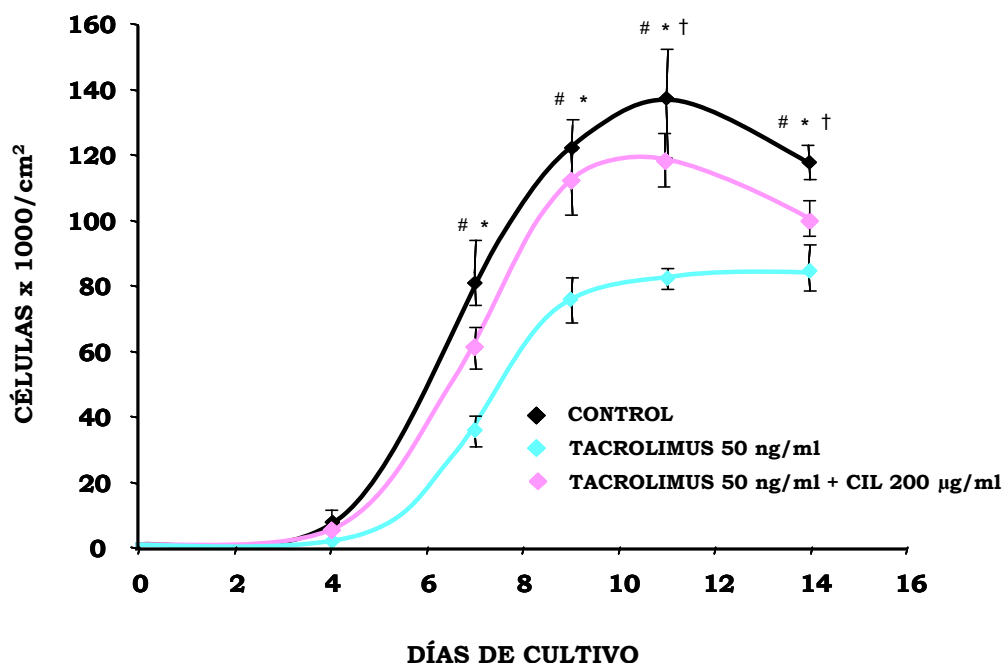
Para comprobar si cilastatina tenía algún efecto sobre la recuperación celular, se realizó un nuevo experimento en el que se ensayó la dinámica de crecimiento de CTP en presencia de dos nefrotóxicos, CsA y tacrolimus, comprobando las diferencias en presencia y ausencia de cilastatina.

Cuando las CTP se hicieron crecer desde el momento de la siembra en presencia de CsA (1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ), el crecimiento de las células se redujo de forma dosis-dependiente, provocando que los cultivos expuestos al nefrotóxico no alcanzasen la confluencia encontrada en el control. Sin embargo, la incubación conjunta de CsA y cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) restaura total o parcialmente el crecimiento celular (Fig. 11).



**FIGURA 11. Efecto de cilastatina en la nefrotoxicidad inducida por CsA en cultivos de células del túbulo proximal.** El número de células se contó en un microscopio invertido (contraste de fase, magnificación 40X). Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM de células viables contadas por  $\text{cm}^2$ . El análisis Post hoc muestra un descenso significativo del crecimiento celular inducido por CsA comparado con el control desde el día 8 (dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ ), y una recuperación del crecimiento celular con cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) desde el día 11. \* CsA vs. control,  $p < 0.05$ ; † cilastatina + CsA vs. control,  $p < 0.05$ ; # cilastatina + CsA (1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) vs. su respectiva CsA,  $p < 0.05$ .

Los cultivos de las CTP se incubaron en presencia de tacrolimus a la concentración que habitualmente se alcanza en plasma (50 ng/ml). El crecimiento celular con este fármaco se vió reducido y recuperado parcialmente cuando se coincubó con cilastatina (200 µg/ml) (Fig. 12).



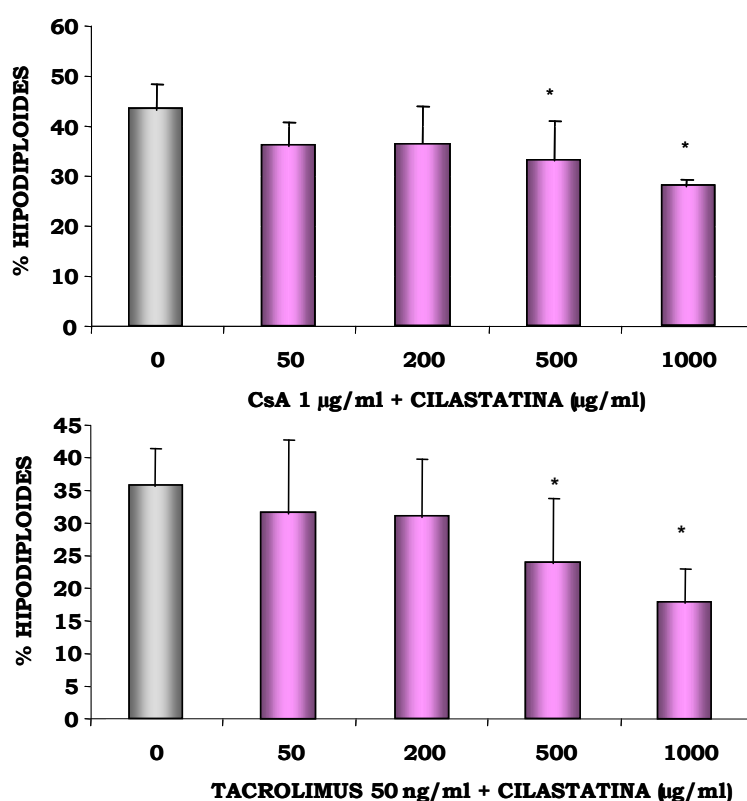
**FIGURA 12. Efecto de cilastatina en la nefrotoxicidad inducida por tacrolimus en cultivos de células del túbulo proximal.** El número de células se contó en un microscopio invertido (contraste de fase, magnificación 40X). Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM de células viables contadas por cm<sup>2</sup>. El análisis Post hoc muestra un descenso significativo del crecimiento celular inducido por tacrolimus (50 ng/ml) comparado con el control desde el día 7, y una recuperación del crecimiento celular con cilastatina (200 µg/ml) desde el día 9. \* tacrolimus vs. control,  $p < 0.05$ ; † tacrolimus + cilastatina vs. control,  $p < 0.05$ ; # tacrolimus + cilastatina vs. tacrolimus,  $p < 0.05$ .

La coincubación con los nefrotóxicos y cilastatina previene de forma parcial el efecto de la CsA y el tacrolimus sobre el crecimiento celular, protegiendo de su nefrotoxicidad.

## 1.2.- INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR

Para conocer si el efecto nefroprotector de cilastatina sobre las CTP tratadas con distintos tóxicos es dosis-dependiente, se estudió el porcentaje de células hipodiploides desprendidas al medio de cultivo sobrenadante en CTP tratadas con una única concentración de CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y tacrolimus (50  $\text{ng/ml}$ ) y concentraciones crecientes de cilastatina. La muerte celular se estudió mediante citometría de flujo sobre las células y corpúsculos apoptóticos desprendidos al medio de cultivo sobrenadante.

La adición de cilastatina a concentraciones crecientes entre 50 – 1000  $\mu\text{g/ml}$  se asoció a una disminución significativa en la proporción de células hipodiploides recuperadas en el sobrenadante en comparación con los controles (Fig. 13), lo que demostraba que la protección ejercida por cilastatina es dosis-dependiente.



**FIGURA 13. Cuantificación del desprendimiento de células hipodiploides tratadas con cilastatina.**

Cuantificación mediante citometría de flujo previa tinción con IP del efecto de dosis crecientes de cilastatina (50-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) en la apoptosis inducida por CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y tacrolimus (50  $\text{ng/ml}$ ) tras 24 h de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos diferentes. CsA: ANOVA Factorial: factor "tratamiento" (niveles de CsA),  $p = 0.03$ ; factor "dosis cilastatina",  $p = 0.042$ ; interacción "tratamiento x dosis cilastatina",  $p = 0.098$ .

El análisis Post hoc muestra reducciones significativas del porcentaje de apoptosis para dosis de cilastatina  $> 200 \mu\text{g/ml}$ , \*  $p < 0.05$ .

TACROLIMUS: ANOVA Factorial: factor "tratamiento" (niveles de tacrolimus),  $p = 0.03$ ; factor "dosis cilastatina",  $p = 0.042$ ; interacción "tratamiento x dosis cilastatina",  $p = 0.098$ . El análisis Post hoc muestra reducciones significativas del porcentaje de apoptosis para dosis de cilastatina  $> 200 \mu\text{g/ml}$ , \*  $p < 0.05$ .

Al estudiar los resultados anteriores y teniendo en cuenta los datos de la tabla 8, se seleccionó la dosis de 200  $\mu\text{g/ml}$  de cilastatina como concentración estándar utilizada en todos los experimentos posteriores. Esta dosis se seleccionó por ser la más cercana al pico alcanzado en plasma en estudios clínicos. Sin embargo, para los experimentos realizados con esta dosis, es de esperar que dosis superiores puedan producir aún mayores efectos.

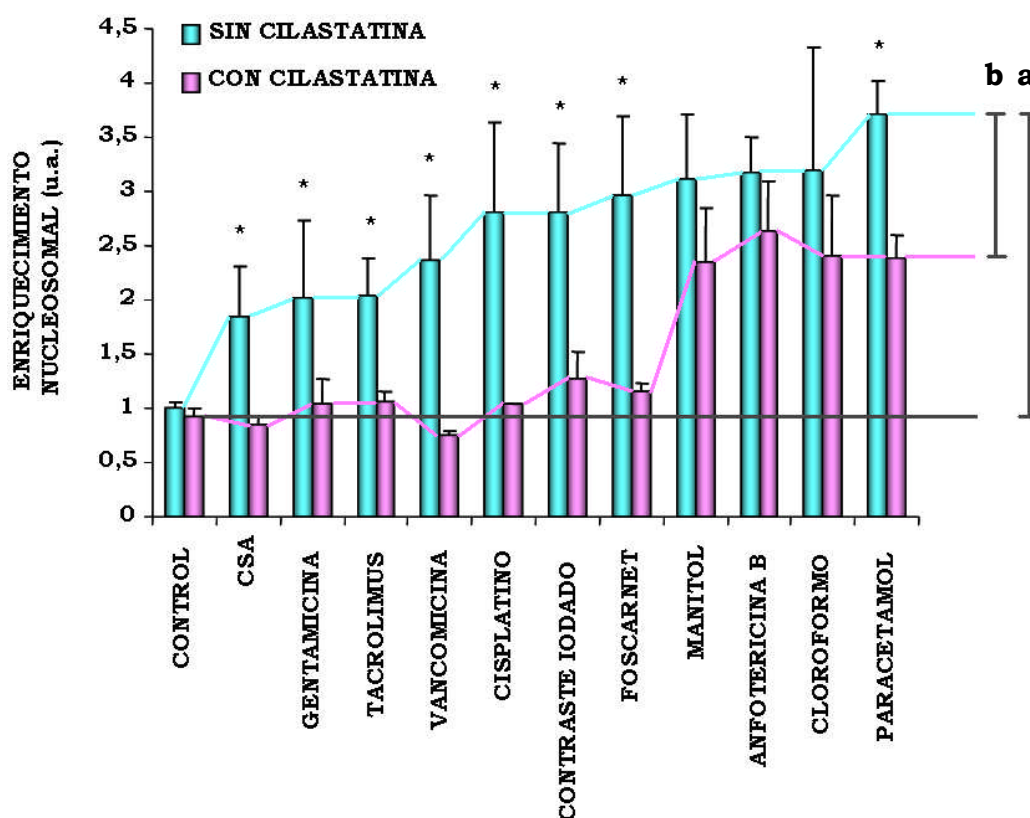
## 2.- ESPECTRO DE TOXICIDAD PROXIMAL: SELECCIÓN DE FÁRMACOS

Los datos del metaanálisis publicado por nuestro laboratorio <sup>159</sup> y los ensayos preclínicos con CsA y tacrolimus <sup>129</sup> nos llevaron a plantear la posibilidad de que cilastatina no sólo protegiese al túbulo contra imipenem, CsA y tacrolimus, sino contra otros nefrotóxicos.

Dado que los mecanismos de dicha nefroprotección no están aún bien definidos, decidimos estudiar nefrotóxicos con mecanismos de acción, características fisico-químicas y acciones terapéuticas muy distintas (ver Materiales y Métodos, tabla 3), pero con un dato en común: su capacidad lesiva sobre el túbulo proximal, para evaluar la actividad nefroprotectora de cilastatina sobre ellos. Dentro de los nefrotóxicos seleccionados se encuentran inmunosupresores (CsA y tacrolimus), antibióticos (vancomicina y gentamicina), quimioterápicos (cisplatino), analgésicos (paracetamol), antivirales (foscarnet), antifúngicos (anfotericina B), contrastes iodados (iopamiro), diuréticos (manitol) y anestésicos (cloroformo). Entre este amplio abanico de fármacos se encuentran tanto compuestos polares como apolares, catiónicos o neutros, liposolubles ó hidrosolubles. Este conjunto de características diferentes está directamente relacionado con el mecanismo que utiliza cada uno de estos fármacos en alcanzar el interior celular. Otras características a tener en cuenta son los mecanismos generales de nefrotoxicidad que utilizan (ver Introducción, apartado 1.3). Dentro de los tóxicos seleccionados algunos actúan ejerciendo su acción sobre el RE, otros a nivel mitocondrial, otros actuando sobre el ADN, etc.

Como método de rastreo rápido para valorar la toxicidad de los fármacos y el posible efecto de cilastatina sobre la toxicidad producida, se determinó la fragmentación del ADN inducida por los nefrotóxicos en CTP en cultivo, cuantificando el enriquecimiento citosólico nucleosomal (Fig. 14). Para ello se empleó una sola concentración de cada fármaco, utilizando como guía el pico de concentración alcanzada en plasma durante el uso clínico de los mismos. Cuando dicho dato no estaba disponible, se utilizaron concentraciones previamente conocidas y descritas como nefrotóxicas.

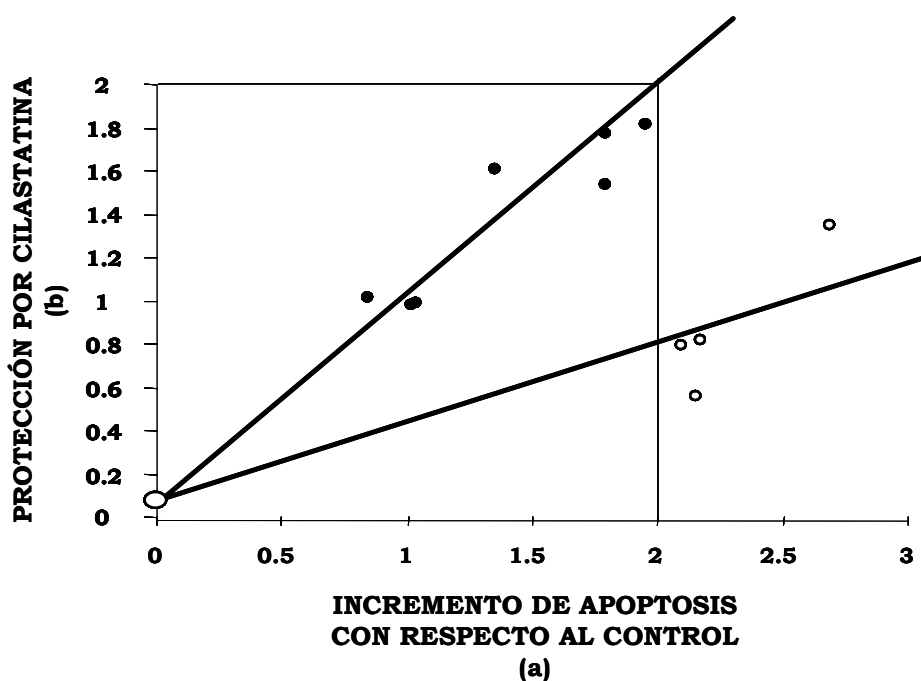
Mediante la cuantificación de los nucleosomas presentes en el citosol puede observarse como después de 48 horas de incubación, todos los fármacos seleccionados fueron capaces de inducir muerte celular en las CTP. Las células coincubadas con cilastatina presentan, una menor muerte celular ( $p < 0.05$  para el factor “cilastatina” en ANOVA). Sin embargo, se observaron dos comportamientos distintos del efecto de cilastatina sobre los tóxicos utilizados; en primer lugar, en algunos de los nefrotóxicos, cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) impide la muerte celular hasta niveles semejantes a los del control, siendo mayor la protección cuanto mayor es el efecto letal del tóxico (foscarnet > contrastes iodados > cisplatino > vancomicina > tacrolimus > gentamicina > CsA). En cambio en otro grupo de fármacos, cilastatina reduce la aparición de los nucleosomas en el citosol inducida por los nefrotóxicos, pero no alcanza los niveles basales de apoptosis encontrados en el control (paracetamol > cloroformo > manitol > anfotericina B). No obstante, la protección por cilastatina para el caso del paracetamol fue significativa, en el análisis Post hoc.



**FIGURA 14. Efecto de cilastatina en el enriquecimiento nucleosomal en células tubulares proximales tratadas con nefrotóxicos.** Disminución con cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) de la fragmentación nucleosomal inducida durante 48 horas de tratamiento con CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), gentamicina (20  $\text{mg/ml}$ ), tacrolimus (50  $\text{ng/ml}$ ), vancomicina (600  $\mu\text{g/ml}$ ), cisplatino (10  $\mu\text{M}$ ), contraste iodado (1  $\text{mg/ml}$ ), foscarnet (1  $\text{mM}$ ), manitol (100  $\text{mosm/l}$ ), anfotericina B (10  $\mu\text{g/ml}$ ), cloroformo (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y paracetamol (300  $\mu\text{g/ml}$ ). En cada experimento el factor de enriquecimiento nucleosomal fue determinado como la proporción de la actividad de peroxidasa en células tratadas comparadas con el control. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. ANOVA: \* efecto de cilastatina sobre cada fármaco;  $p < 0.05$ .



Al representar gráficamente la intensidad de la lesión celular (**intervalo “a”** en figura 14: incremento de apoptosis con respecto al control) contra la protección observada por cilastatina (**intervalo “b”** en figura 14), se confirmó la existencia de los dos comportamientos, el primero para CsA, gentamicina, tacrolimus, vancomicina, cisplatino, contraste iodado y foscarnet, y el segundo para manitol, anfotericina B, cloroformo y paracetamol (Fig. 15).



**FIGURA 15. Incremento de apoptosis generada por los fármacos frente a la protección por cilastatina.** Distribución y regresión lineal de los tóxicos relacionando la protección por cilastatina con la apoptosis inducida.

El significado potencial de este comportamiento se discute más adelante.

Una vez conocida la existencia de dos grupos de tóxicos con comportamientos diferentes, para seleccionar los fármacos que fueron utilizados en experimentos posteriores, nos basamos en que para estudiar cilastatina más a fondo se requieren fármacos representativos de amplio uso clínico, y con características físico-químicas diferentes. Por ello se seleccionaron cinco fármacos del primer grupo (CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina y cisplatino) y uno del segundo grupo (paracetamol).

### 3.- EFECTO DE LOS NEFOTÓXICOS A NIVEL CELULAR. PROTECCIÓN POR CILASTATINA

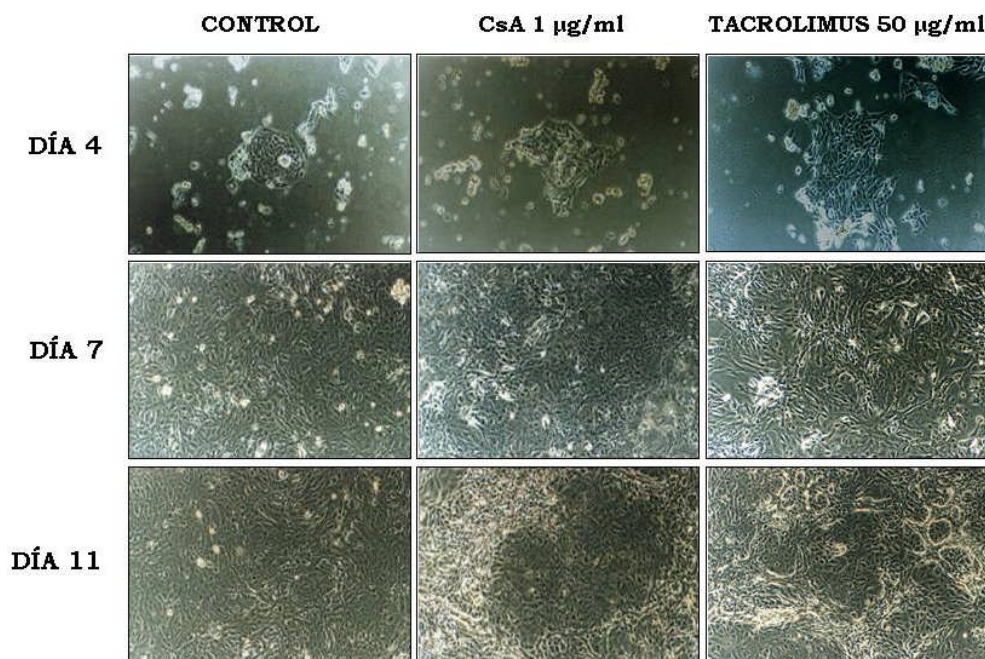
Una vez seleccionados los fármacos a estudiar, los siguientes experimentos fueron destinados a confirmar la existencia de la supuesta nefroprotección tanto a nivel estructural como funcional.

Cuando las CTP son tratadas con los tóxicos seleccionados, se desencadena una respuesta apoptótica que puede estudiarse a varios niveles. Este daño celular produce cambios morfológicos y funcionales a nivel de estructuras de membrana, núcleo celular y orgánulos como la mitocondria.

#### 3.1.- CAMBIOS ESTRUCTURALES

Es un hecho conocido que numerosas nefrotoxinas generan daño renal. Para conocer el daño generado por sustancias tóxicas, como CsA y tacrolimus sobre el túbulo proximal, se realizó un estudio de morfología celular de las CTP mediante microscopía óptica.

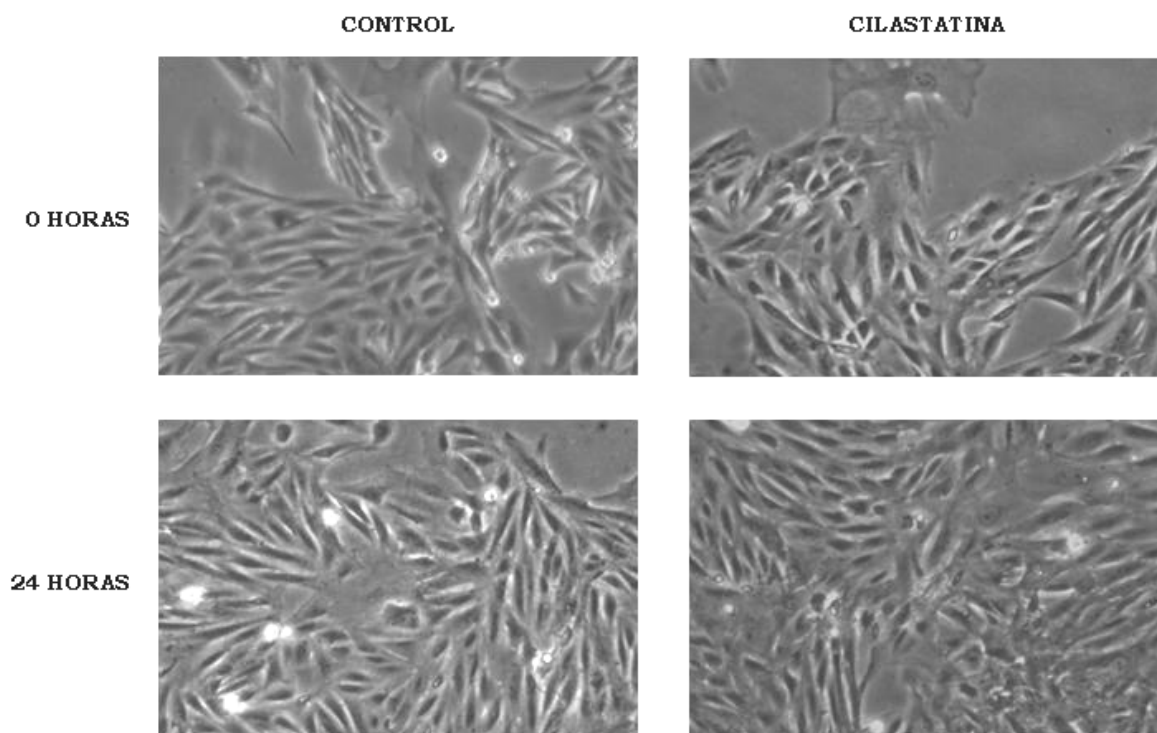
En la figura 16 se muestran imágenes de cultivos controles y tratados con CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o con tacrolimus (50 ng/ml) a días 4, 9 y 11 desde la siembra. En el cultivo control las células mueren por senescencia con una distribución aleatoria que va dando al cultivo una apariencia de “campo estrellado” en las últimas fases. En cambio, las células que mueren al ser tratadas con CsA y tacrolimus lo hacen en zonas limitadas, aparentemente preferenciales. Puede observarse claramente que la muerte es mayor en presencia de los nefrotóxicos (Fig.16).



**FIGURA 16. Morfología de cultivos primarios de células del túbulo proximal tratados con CsA y tacrolimus.** Imágenes representativas de muerte celular de los cultivos tratados con CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o tacrolimus (50 ng/ml) en los días 4, 9 y 11 desde la siembra observada por microscopía óptica (contraste de fases)(magnificación 20X).

Analizado el hecho de que existe una mayor muerte celular por la presencia de nefrotóxicos, intentamos estudiar si ésta era reducida en presencia de cilastatina.

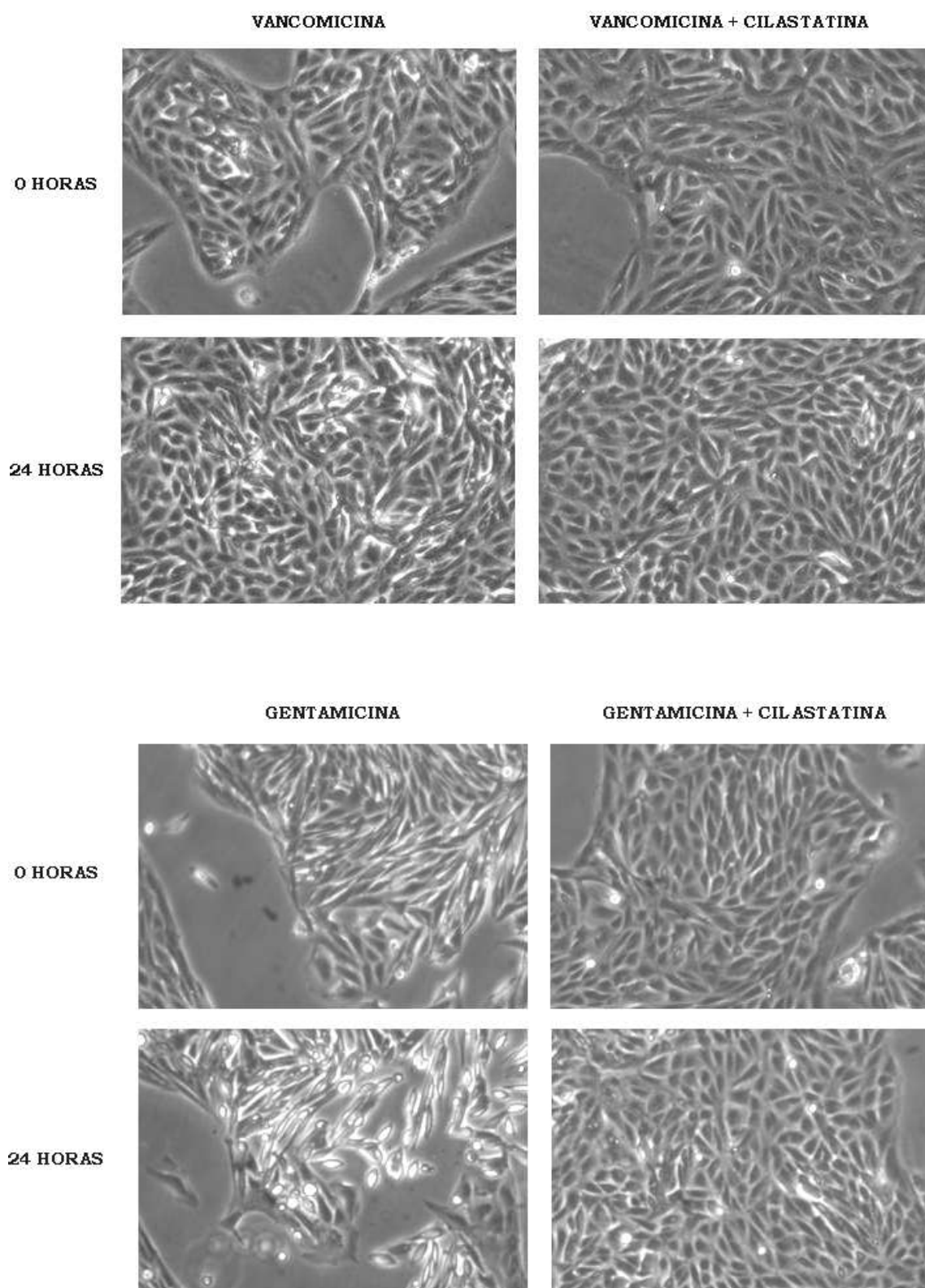
La figura 17 muestra las fotografías tomadas por microscopía óptica de cultivos de CTP control y tratados con cilastatina (200 µg/ml) a tiempos 0 y 24 horas. Puede observarse como el cultivo tratado con cilastatina no presenta diferencias con respecto al control.



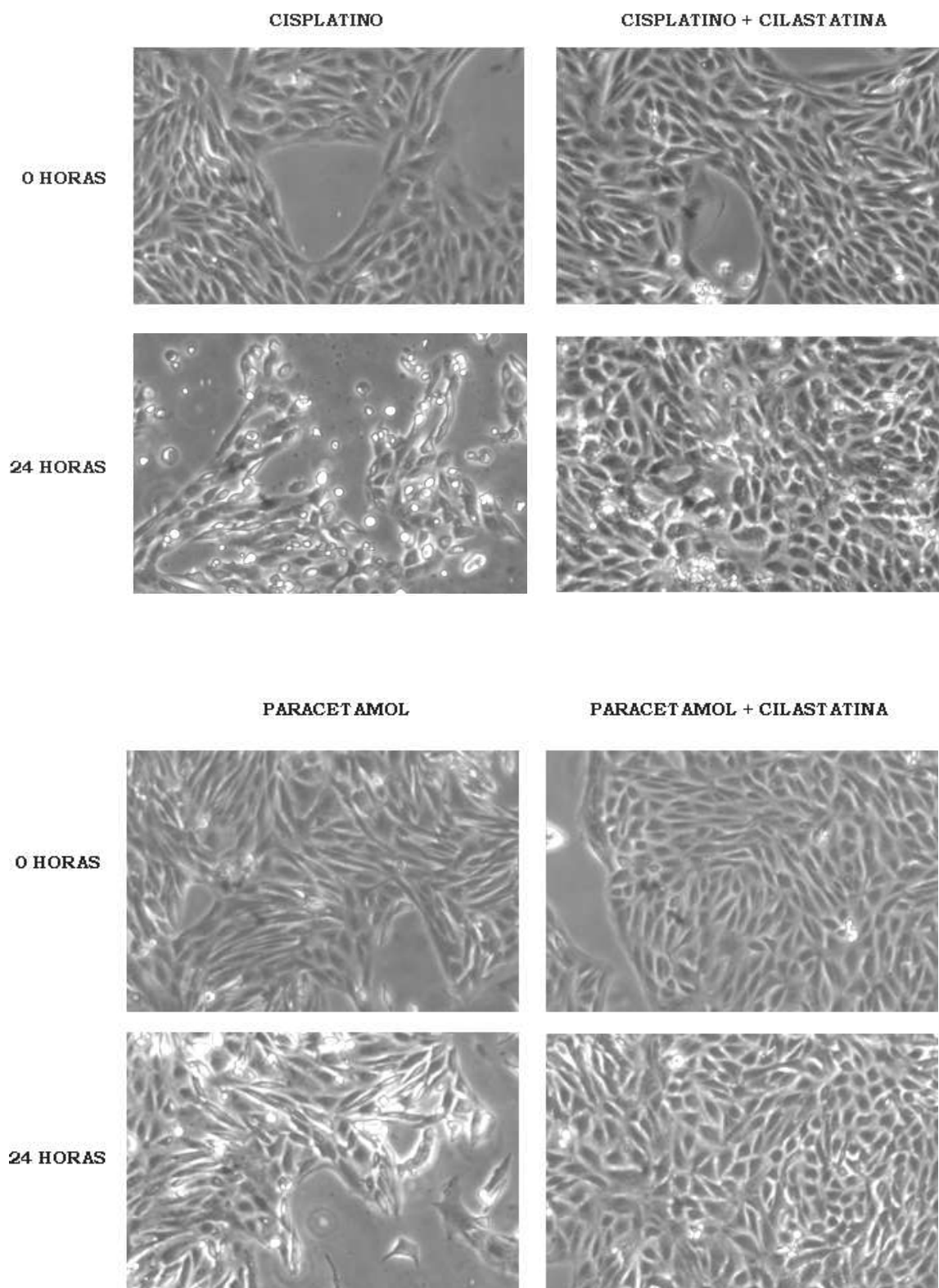
**FIGURA 17. Morfología del cultivo de células del túbulo proximal tratado con cilastatina.** Imágenes representativas de cultivos de CTP tratadas con cilastatina (200 µg/ml) durante 24 horas. No se encuentran diferencias morfológicas entre las células control y las células tratadas con cilastatina (magnificación 40X).

Corroborando los datos presentados en la figura 10, en la figura anterior se muestra como la adición de cilastatina a los cultivos celulares no genera cambios estructurales, pérdida celular, ni aceleración del crecimiento al compararlos con la situación control donde no se administró cilastatina y se obtuvo un crecimiento celular normal.

En las figuras 18 y 19 puede observarse la morfología de las CTP tratadas con distintos tóxicos como vancomicina (600 µg/ml), gentamicina (20 mg/ml), cisplatino (30 µM) y paracetamol (300 µg/ml) en presencia y ausencia de cilastatina. Los cultivos coincubados con los fármacos y cilastatina mostraron un menor grado de muerte celular al compararlos con los cultivos tratados únicamente con los nefrotóxicos. La coincubación con cilastatina permitió el crecimiento celular de los cultivos hasta alcanzar confluencia, mientras que los cultivos tratados con los tóxicos no llegaban a alcanzar la confluencia (Figs. 18 y 19).



**FIGURA 18. Morfología del cultivo de células del túbulo proximal. Efecto de vancomicina y gentamicina en presencia y ausencia de cilastatina.** Imágenes representativas obtenidas por microscopía óptica de cultivos tratados durante 24 horas con vancomicina (600 µg/ml) y gentamicina (20 mg/ml). Las placas tratadas sólo con los nefrotóxicos mostraron un mayor índice de muerte celular que los cultivos tratados con los fármacos más cilastatina (200 µg/ml) (magnificación 40X).



**FIGURA 19. Morfología del cultivo de células del túbulo proximal. Efecto de cisplatino y paracetamol en presencia y ausencia de cilastatina.** Imágenes representativa obtenidas por microscopía óptica de cultivos tratados durante 24 horas con cisplatino (30  $\mu$ M) y paracetamol (300  $\mu$ g/ml). Las placas tratadas sólo con los nefrotóxicos mostraron un mayor índice de muerte celular que los cultivos tratados con los fármacos más cilastatina (200  $\mu$ g/ml) (magnificación 40X) .

### **3.2.- CAMBIOS FUNCIONALES**

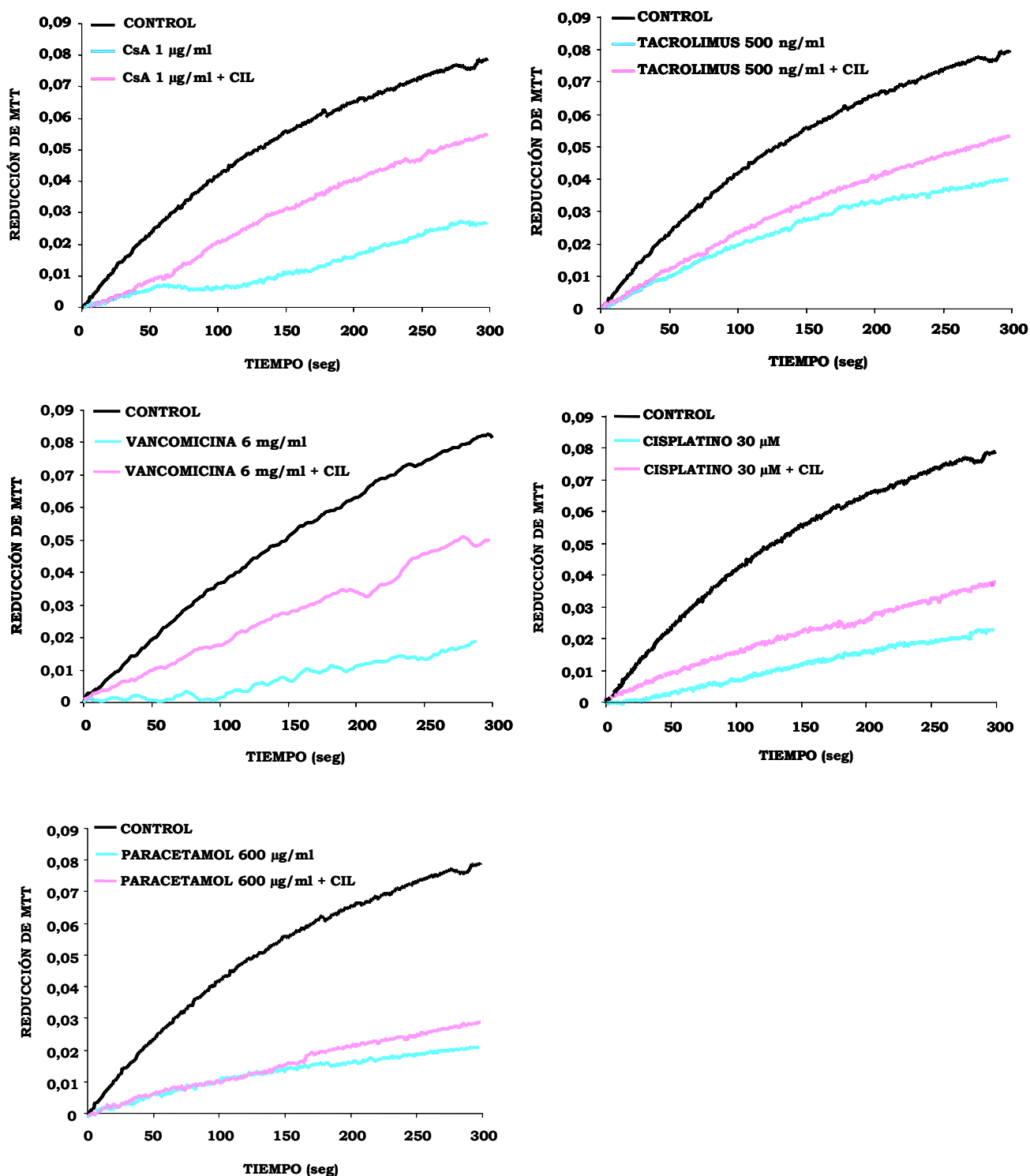
Los estudios morfológicos confirmaron que la muerte celular observada en las primeras 24 horas es interferida por cilastatina. En los resultados que se presentan a continuación, se estudiaron de modo cuantitativo los aspectos funcionales que subyacen y preceden a estos cambios morfológicos.

#### **3.2.1.- *Cilastatina reduce la interferencia de los tóxicos con la cadena mitocondrial***

La mitocondria del túbulo proximal es probablemente la organela que resulta alterada más precozmente durante la muerte celular por apoptosis. En la mitocondria van a tener lugar numerosos cambios, como por ejemplo alteración de la cadena respiratoria, modificación del potencial de membrana mitocondrial, liberación del citocromo C, etc. Así pues, estudiar la función de la cadena respiratoria mitocondrial en relación con los nefrotóxicos valorados puede ser útil para entender la latencia del fenómeno de protección.

En la figura 20 se presentan los resultados tras medir en tiempo real la actividad de la cadena oxidativa mitocondrial a través de la transferencia electrónica del MTT, que al reducirse se transforma en azul de formazán. Se han seleccionado las dosis más altas de los nefrotóxicos estudiados para cuantificar en tiempo real la formación de azul de formazán (oxidación mitocondrial) sobre células aisladas registradas mediante un microespectrofotómetro. El registro recoge por tanto los efectos de los fármacos y de cilastatina sobre la transferencia electrónica en los cinco primeros minutos que siguen a la adición del tóxico a las células.

Al seguirse la reducción en tiempo real en cultivos control, pudo observarse como aumentaba la absorbancia a medida que se iba produciendo la reducción del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales e iba apareciendo el producto coloreado. Cuando los cultivos eran sometidos a CsA, tacrolimus, vancomicina y cisplatino, se observó como la capacidad mitocondrial de reducción del MTT a azul de formazán se veía inhibida significativamente y de modo intenso. Sin embargo, cuando se sometían los cultivos a la coincubación del tóxico con cilastatina, se comprobó que ésta protegía parcialmente contra esta inhibición (Fig. 20). En el caso de paracetamol, en presencia de cilastatina se observó que la protección es mucho menos marcada. Este experimento no se pudo llevar a cabo con gentamicina por la interferencia de su espectro de absorción con el del azul de formazán.

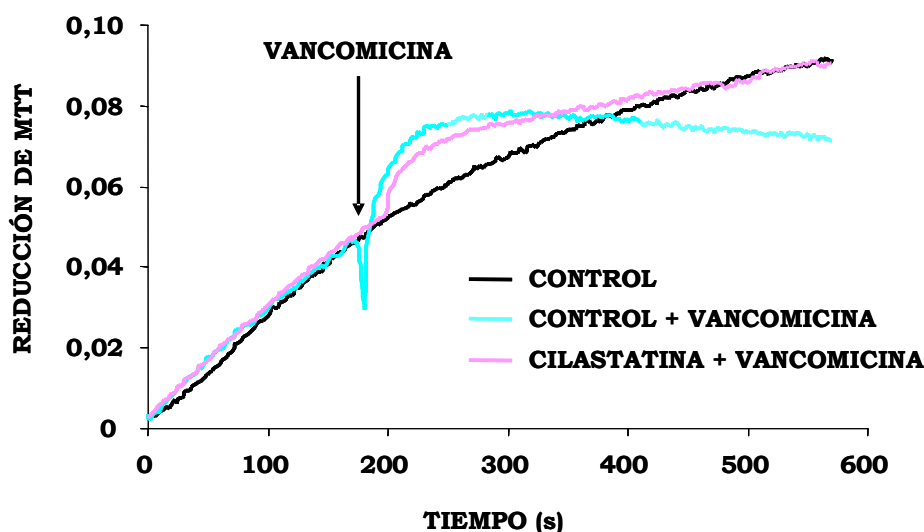


**FIGURA 20. Reducción mitocondrial del MTT en tiempo real en las células del túbulo proximal.** Se representa la absorbancia de formazán detectada en células aisladas sin ningún tratamiento (control) o incubadas con las concentraciones de nefrotóxico que se indican sobre la gráfica, en ausencia o en presencia de cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ), transcurridos 300 segundos de tiempo de incubación.

Este ensayo en tiempo real sobre células en cultivo aisladas ha sido descrito y realizado por vez primera en nuestro laboratorio, y nos ha servido para presentar evidencias de la rapidez con la que los nefrotóxicos ensayados interfieren con la función oxidativa mitocondrial.



En la figura 21 se determina la actividad mitocondrial en tiempo real de un cultivo de CTP tratado con vancomicina en presencia y ausencia de cilastatina. Se puede comprobar como una vez empezado el registro, al añadir vancomicina se observa de modo instantáneo un aumento en la actividad oxidativa de la cadena respiratoria mitocondrial, seguido de una parada de esta actividad que la bibliografía ha interpretado como lesión mitocondrial. Cuando se realizó el ensayo en presencia de cilastatina (añadida desde el principio del registro), y se añadió el tóxico (una vez empezado el registro), vancomicina produjo un aumento menor de la respiración, pero la reducción del MTT no sufría la parada observada en el caso anterior, sino que éste se seguía reduciendo aunque a un ritmo inferior al control.



**FIGURA 21. Reducción mitocondrial del MTT en tiempo real en las células del túbulo proximal tratadas con vancomicina en presencia y ausencia de cilastatina.** El tratamiento de las células durante 20 minutos con vancomicina (25 mg/ml) disminuyó la absorbancia del MTT reducido. La adición de vancomicina produce de forma instantánea un aumento inicial seguido de una inhibición de la reducción del MTT. La presencia de cilastatina (200 µg/ml) impidió esta inhibición.

La vancomicina interfiere con la mitocondria presentando una respuesta bifásica. Es decir, una respuesta inicial en la que se produce durante unos 40 segundos una activación de la cadena respiratoria, y una respuesta secundaria inmediatamente posterior donde tiene lugar una inhibición de la misma. Cilastatina no modificó la respuesta inicial, pero sí impidió la inhibición de la cadena respiratoria que tenía lugar en la segunda fase. Que este efecto sea instantáneo tras la adición de vancomicina, sugiere que no son necesarios mecanismos y modificaciones de la transcripción y traducción, por lo tanto, indica que cilastatina no ejerce su acción sobre síntesis e inhibición molecular, sino que parece que es posible que cilastatina esté interfiriendo con la accesibilidad de los fármacos utilizados a sus dianas intracelulares.



### ***3.2.2.- Cilastatina protege la integridad funcional de la mitocondria frente al ataque nefrotóxico***

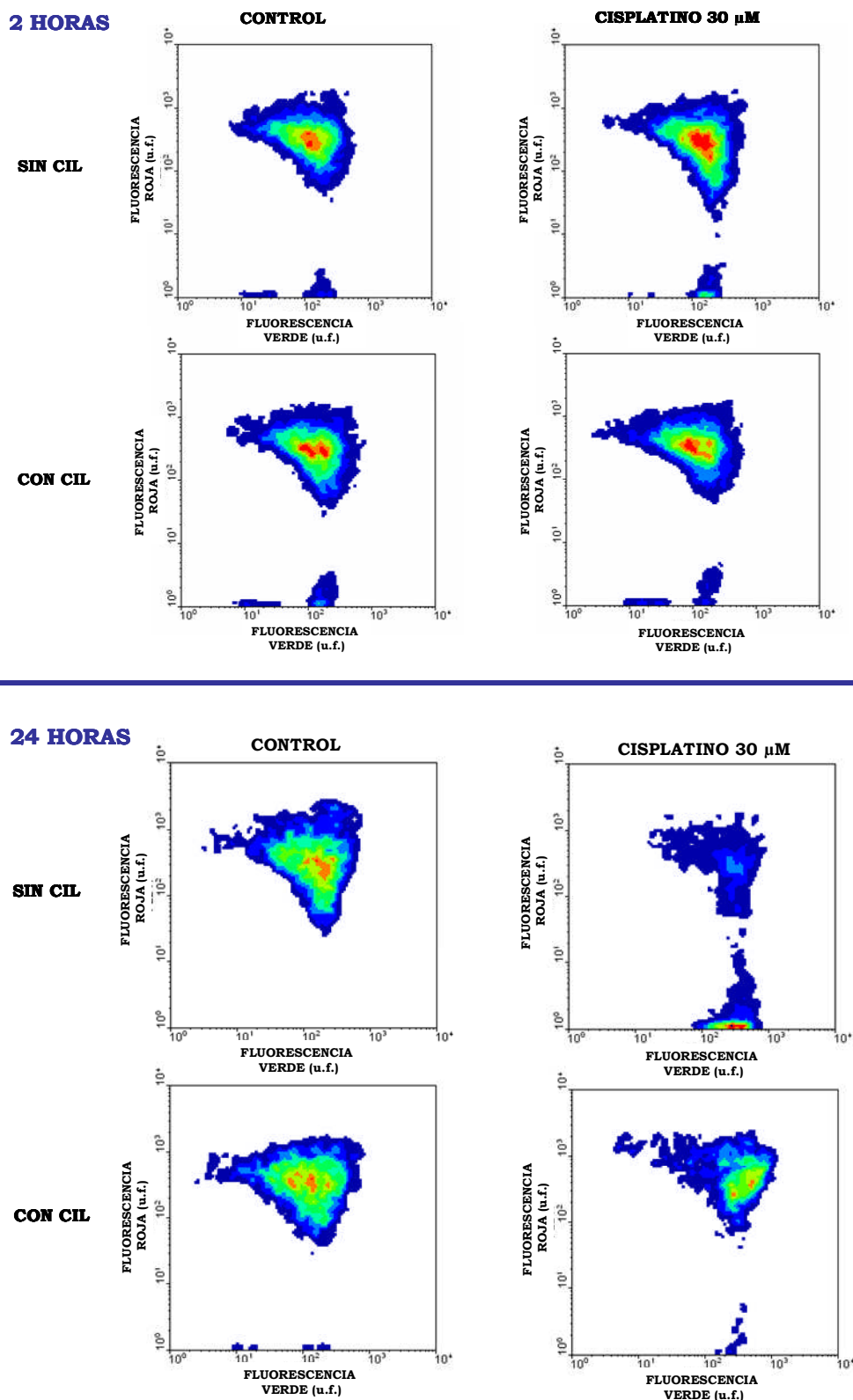
Bajo condiciones control, la oxidación de NADPH, FADH<sub>2</sub> y FMNH<sub>2</sub> bombea H<sup>+</sup> fuera de la matriz mitocondrial, creando un gradiente electronegativo intramitocondrial necesario tanto para realizar la fosforilación del ADP a ATP como para eventualmente detoxificar calcio. La lesión de la cadena respiratoria, la pérdida de integridad de la membrana o la apertura irreversible del PPTM son mecanismos por los que un nefrotóxico puede producir la pérdida del potencial mitocondrial, la traslocación de citocromo C y la activación de la cascada de las caspasas.

#### ***3.2.2.1.- Cambio en el potencial de membrana mitocondrial***

Una vez observado que los nefrotóxicos interaccionan con la cadena respiratoria disminuyendo su capacidad oxidativa, quisimos estudiar si el potencial de membrana se encontraba alterado y cual era el efecto del cotratamiento con cilastatina utilizando CTP en cultivo.

Para cuantificar el potencial mitocondrial se ha utilizado el colorante JC-1. Es un marcador catiónico que se acumula en la membrana mitocondrial cuando ésta está intacta, produciendo un desplazamiento en el pico de su emisión del verde (525 nm) al rojo (590 nm). A elevados potenciales de membrana mitocondrial, JC-1 forma agregados que emiten con alta intensidad en el canal rojo. A medida que la mitocondria va sufriendo una pérdida de potencial de membrana mitocondrial, se forman menos agregados, se reduce la intensidad de fluorescencia roja y puede aumentar la fluorescencia del verde.

Los resultados obtenidos se muestran mediante diagramas de densidad al representar fluorescencia verde (abscisas) frente a roja (ordenadas). Se utiliza una escala artificial de color para representar la densidad de eventos en un área determinada. En la figura 22 puede observarse como a las 2 horas de tratamiento con cisplatino (30 µM) el diagrama de densidad no es diferente del control, y se mantiene prácticamente igual en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml). En el tratamiento de 24 horas con cisplatino puede observarse como disminuye la densidad de células con fluorescencia roja, mientras que en el tratamiento de cisplatino con cilastatina se mantiene la densidad de marcaje en la misma posición que en la situación control y por tanto el patrón de distribución en el diagrama de densidad no varía (Fig. 22).

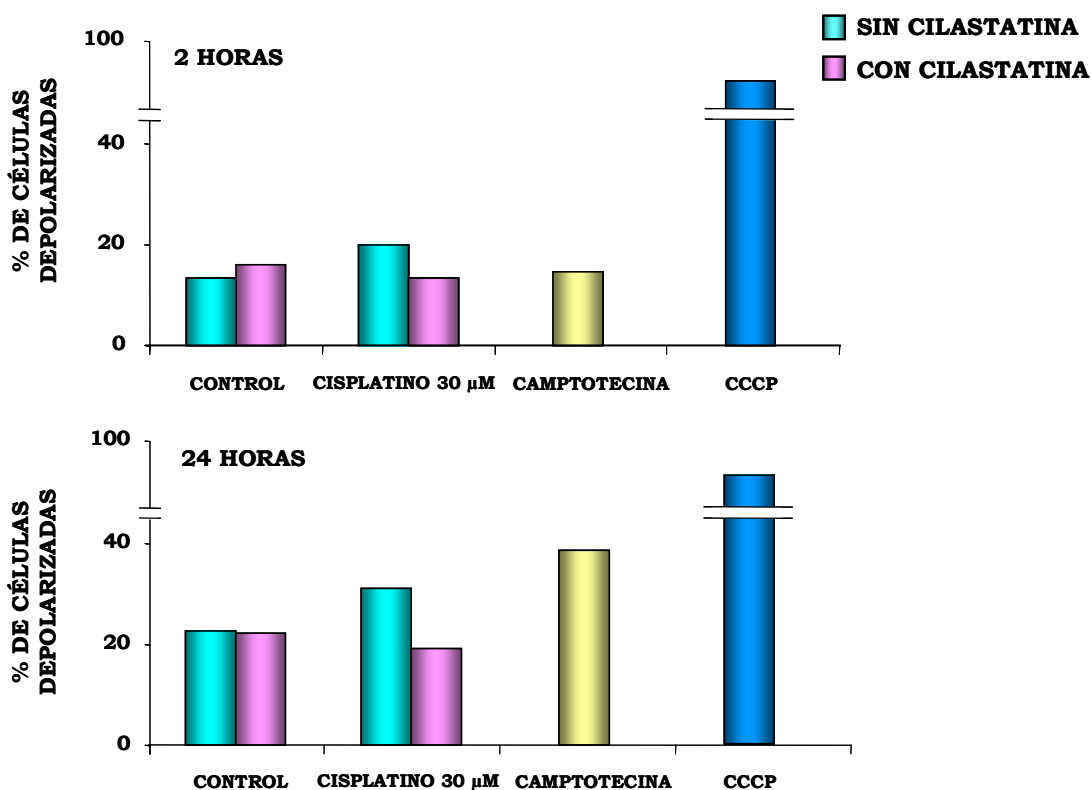


**FIGURA 22. Representación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante diagramas de densidad en células tratadas con cisplatino en presencia y ausencia de cilastatina.** Las células fueron incubadas durante 2 y 24 horas en ausencia de tratamiento, con cilastatina (200  $\mu$ g/ml) y con cisplatino 30  $\mu$ M  $\pm$  cilastatina (200  $\mu$ g/ml). Tras 2 horas de tratamiento con cisplatino, no se encontraron grandes diferencias. A las 24 horas con cisplatino, disminuye la densidad de células con fluorescencia roja. El tratamiento con cilastatina a 24 horas presenta un patrón semejante a la situación control.

En la figura 23 se muestra el porcentaje de células depolarizadas (baja fluorescencia roja) cuantificado tras 2 y 24 horas de tratamiento con cisplatino (30  $\mu$ M) en presencia y ausencia de cilastatina (200  $\mu$ g/ml). Puede observarse como el cisplatino tras 2 horas de tratamiento ha producido pequeños cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, el tratamiento con cisplatino en presencia de cilastatina presenta unos niveles de depolarización semejantes a los encontrados en la situación control (Fig. 23).

A las 24 horas puede observarse un efecto ligeramente superior del cisplatino sobre el potencial de membrana al encontrar un mayor porcentaje de células depolarizadas. La coadministración de cilastatina con cisplatino, reduce de nuevo el porcentaje de células depolarizadas alcanzando valores semejantes al control.

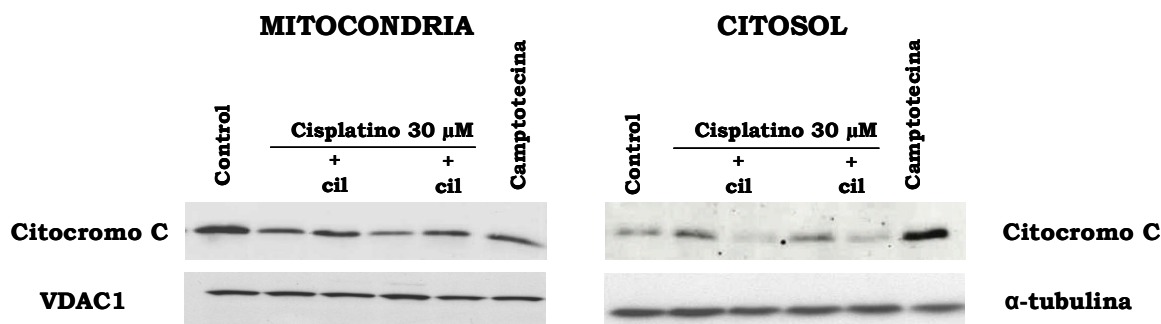
Al estudiar los controles positivos pudimos comprobar como camptotecina a las 2 horas no había producido depolarización mitocondrial, y como tras 24 horas de tratamiento esta depolarización había aumentado. El control positivo interno de la técnica, el protonóforo CCCP, demostró la efectividad de ésta al provocar depolarización prácticamente en el 100% de las células tras su tratamiento.



**FIGURA 23. Cuantificación del potencial de membrana en CTP tratadas con cisplatino en ausencia y presencia de cilastatina durante 2 y 24 horas.** Las células fueron incubadas durante 2 y 24 horas en ausencia de tratamiento (control), con cilastatina (200  $\mu$ g/ml), cisplatino (30  $\mu$ M)  $\pm$  cilastatina (200  $\mu$ g/ml) y camptotecina (50  $\mu$ g/ml). Se utilizó el control interno de la técnica incubando células sin tratar con CCCP (50 mM) durante 5 minutos. Puede observarse como a las 2 horas y más notablemente a las 24 horas de tratamiento, el cisplatino ya modifica el potencial de membrana al producir depolarización mitocondrial y como la presencia de cilastatina devuelve en ambos tiempos de incubación los niveles de despolarización a la situación control.

### 3.2.2.2.- Cilastatina reduce la liberación de citocromo C como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana

La liberación de citocromo C desde la mitocondria al citosol se ha cuantificado determinando la presencia de éste en la fracción mitocondrial y en la citosólica por western blot. En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos. Las células control mayoritariamente presentan el citocromo C en la fracción mitocondrial ya que son células no tratadas que no han sufrido apoptosis, (no ha tenido lugar la translocación del citocromo C al citosol). Tras el tratamiento con cisplatino (30  $\mu$ M) se observa una disminución de citocromo C en la fracción mitocondrial y un aumento en la citosólica con respecto a la situación control. Sin embargo, en la coadministración de cisplatino y cilastatina (200  $\mu$ g/ml) aparece una mayor cantidad de citocromo C en la fracción mitocondrial y menor en la citosólica que durante el tratamiento con cisplatino. El control positivo de apoptosis, camptotecina (50  $\mu$ g/ml), presenta una translocación importante de citocromo C de la mitocondria al citosol. Por lo tanto, la presencia de cilastatina en el tratamiento con cisplatino reduce la liberación del citocromo C desde la mitocondria al citosol. Resultados semejantes a los presentados para el tóxico cisplatino han sido observados en los tratamientos con CsA y tacrolimus (Fig. 24).



**FIGURA 24. Liberación de citocromo C inducida por cisplatino en presencia y ausencia de cilastatina.** Imágenes representativas de western blotting donde se muestra la liberación de citocromo C desde la mitocondria al citosol. Las células fueron tratadas durante 12 horas con cisplatino (30  $\mu$ M)  $\pm$  cilastatina (200  $\mu$ g/ml). Como control positivo de apoptosis se incubaron las células el mismo tiempo con camptotecina (50  $\mu$ g/ml). Puede observarse como la presencia de cilastatina en el tratamiento de cisplatino reduce la liberación del citocromo C desde la mitocondria al citosol.

### 3.3.- CILASTATINA IMPIDE O REDUCE LA APOPTOSIS CELULAR

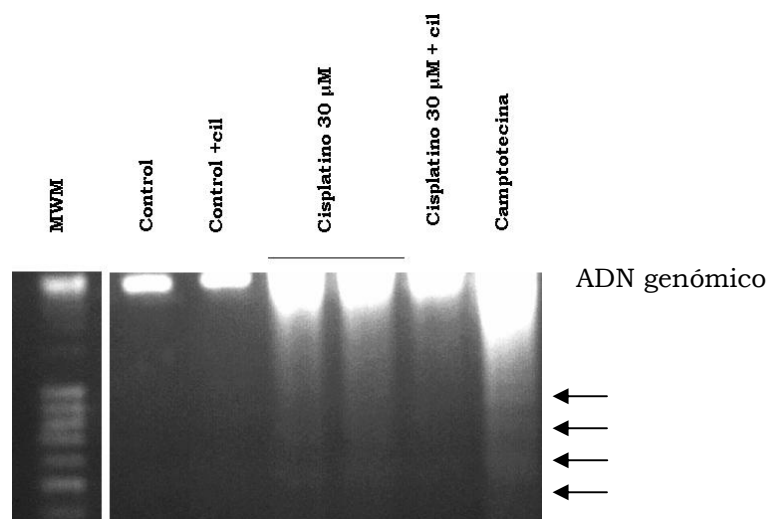
Hasta el momento cilastatina parecía capaz de interferir con los primeros pasos efectores de la apoptosis de los distintos nefrotóxicos estudiados, restaurando total o parcialmente la transferencia electrónica mitocondrial, la conservación del potencial de membrana y la compartimentalización del citocromo C. Teniendo en cuenta los aspectos morfológicos descritos al inicio de esta sección y la aparente reducción en la aparición de nucleosomas, hemos planteado estudiar si cilastatina podría interferir también con los pasos finales de la apoptosis, la fragmentación nucleosomal y la muerte celular por anoikis (desprendimiento celular de la monocapa de cultivo).

#### 3.3.1.- Cilastatina impide o reduce la fragmentación del ADN y la aparición de nucleosomas en el citosol

Durante el proceso de apoptosis las endonucleasas endógenas fragmentan el ADN en oligo-nucleosomas que pasan al citoplasma donde permanecen durante varias horas <sup>45</sup> antes de pasar a formar parte de los “blebs” o corpúsculos apoptóticos.

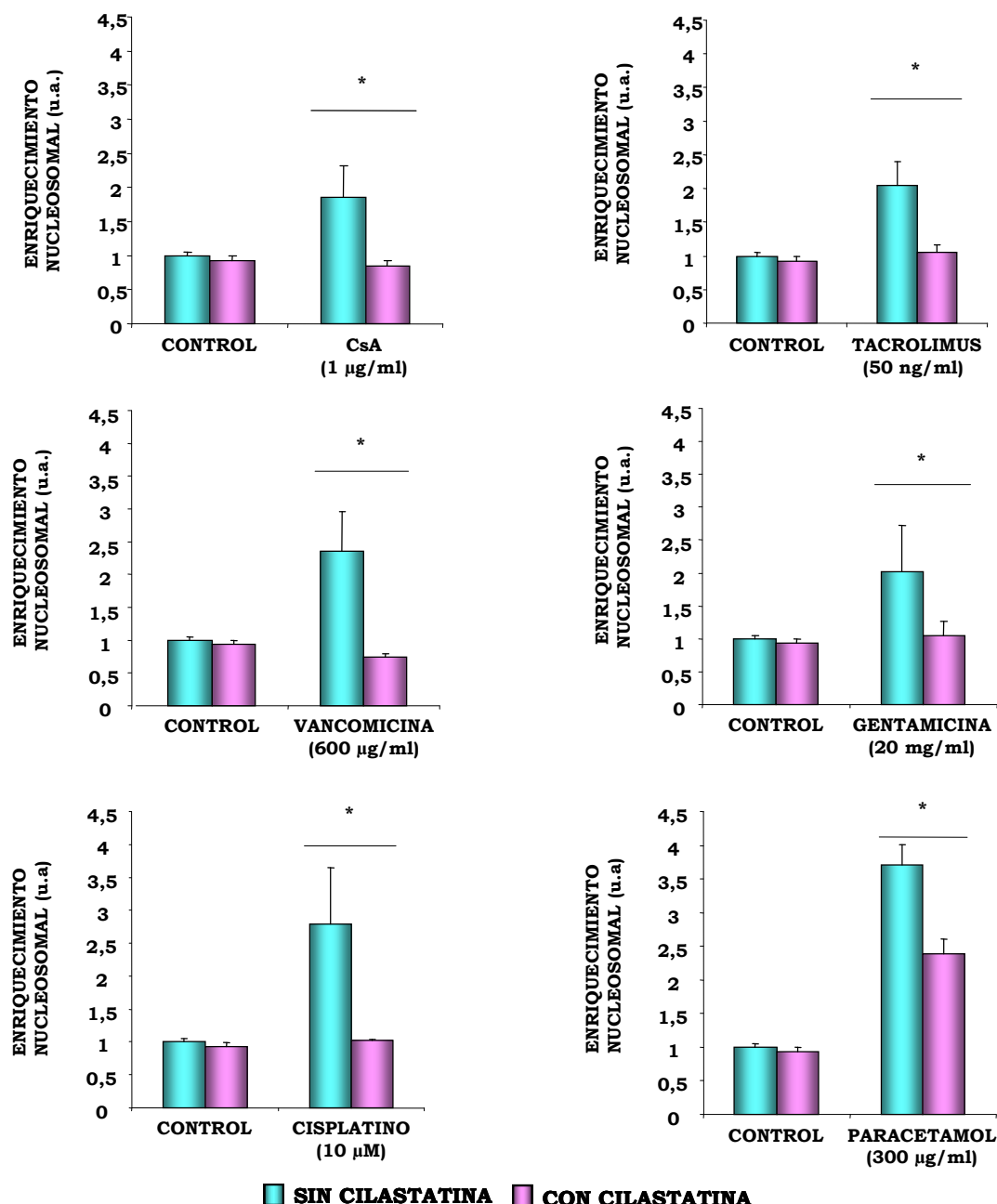
Para confirmar que los tóxicos producen una lesión al ADN se determinó su fragmentación utilizando geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. En la figura 25 se muestra la fragmentación del ADN producida por el tratamiento con cisplatino (30  $\mu$ M) en presencia y ausencia de cilastatina (200  $\mu$ g/ml). Puede observarse como en el control y control con cilastatina no aparece degradación del ADN, mientras que en las células tratadas con camptotecina (control positivo de apoptosis) se hace visible un patrón de fragmentación del ADN en forma de escalera. Las células tratadas con cisplatino muestran un patrón de fragmentación del ADN semejante al encontrado en el control positivo. Por último, cuando las células se coincubaban con cisplatino y cilastatina la fragmentación del ADN parece menor a la encontrada en el tratamiento con cisplatino (Fig. 25).

**FIGURA 25. Reducción por cilastatina de la fragmentación nuclear de ADN, inducida por cisplatino.** Las células se trataron durante 24 horas con los siguientes tratamientos: células control con y sin cilastatina (200  $\mu$ g/ml), cisplatino (30  $\mu$ M)  $\pm$  cilastatina y camptotecina (50  $\mu$ g/ml) como control positivo de apoptosis. MWM: marcador de peso molecular.



Esta técnica no proporcionó resultados significativos para el resto de fármacos estudiados. En consecuencia, se utilizó el enriquecimiento nucleosomal que habíamos usado como test de rastreo para cuantificar la fragmentación del ADN (Fig. 14).

En la figura 26 se muestra el resultado de la cuantificación de los oligonucleosomas citosólicos al tratar las CTP con los distintos tóxicos en presencia y ausencia de cilastatina. Todos los fármacos seleccionados fueron capaces de activar la formación de nucleosomas citoplásmicos en las CTP y la coincubación con cilastatina presentó una reducción significativa en la misma ( $p < 0.05$  para el factor cilastatina).

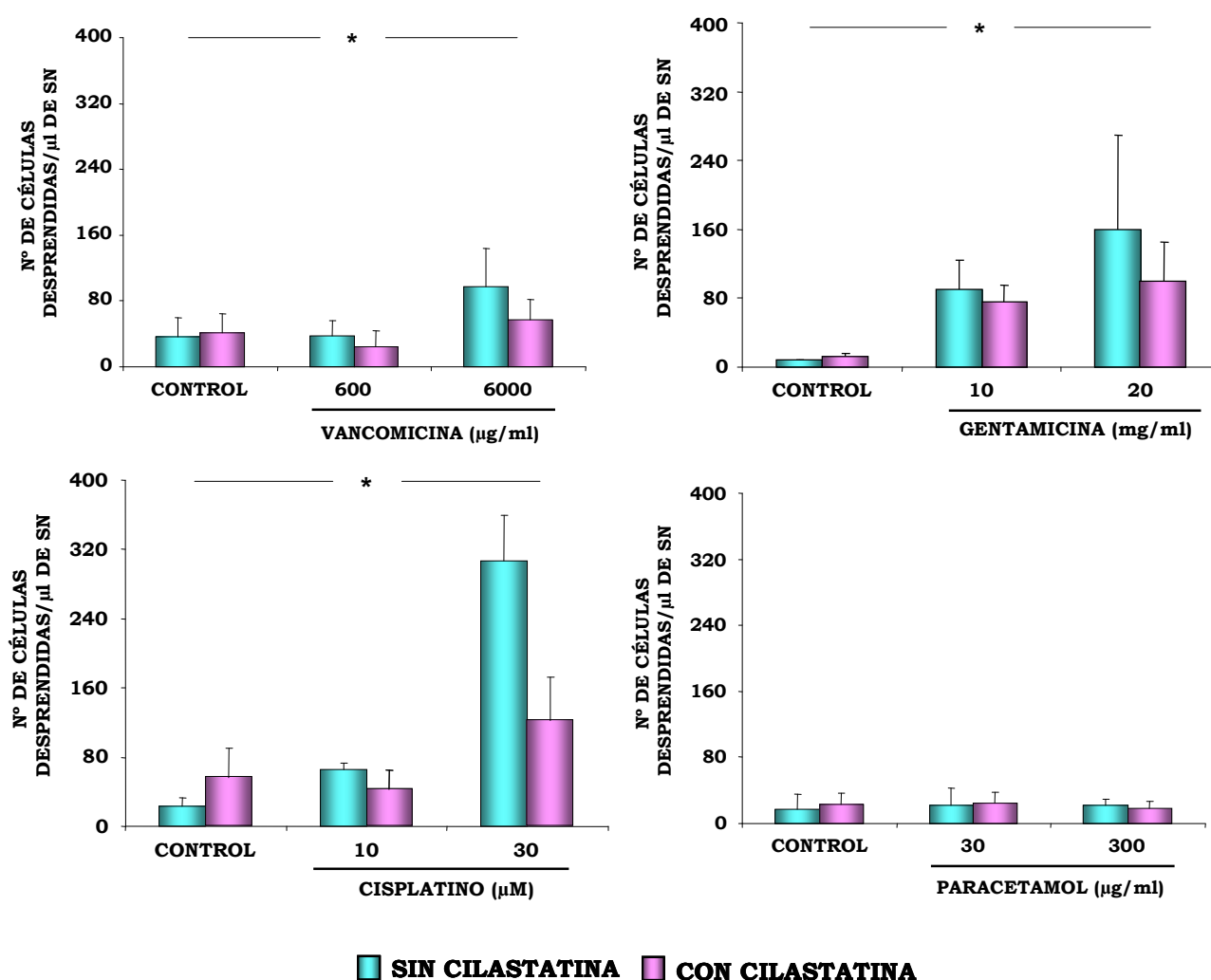


**FIGURA 26. Efecto de cilastatina en el enriquecimiento nucleosomal en células tubulares proximales tratadas con nefrotóxicos.** Disminución con cilastatina (200µg/ml) de la apoptosis inducida durante 48 horas de tratamiento con CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina, cisplatino y paracetamol. En cada experimento el factor de enriquecimiento nucleosomal fue determinado como la proporción de la actividad de peroxidasa en células tratadas comparadas con el control. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos diferentes. ANOVA: \* efecto de cilastatina sobre cada fármaco:  $p < 0.05$ .

### 3.3.2.- Cilastatina impide o reduce la muerte celular por anoikis

La agresión tóxica o isquémica sobre el túbulo se traduce en un tipo de muerte celular asociada al desprendimiento de las células dañadas, proceso conocido como anoikis. La inducción de anoikis por los nefrotóxicos se ha estudiado cuantificando el número de células que se desprenden de la monocapa celular al sobrenadante del cultivo, mediante citometría de flujo. La adición de cilastatina a los cultivos redujo en todos los casos y de modo significativo el número de células muertas.

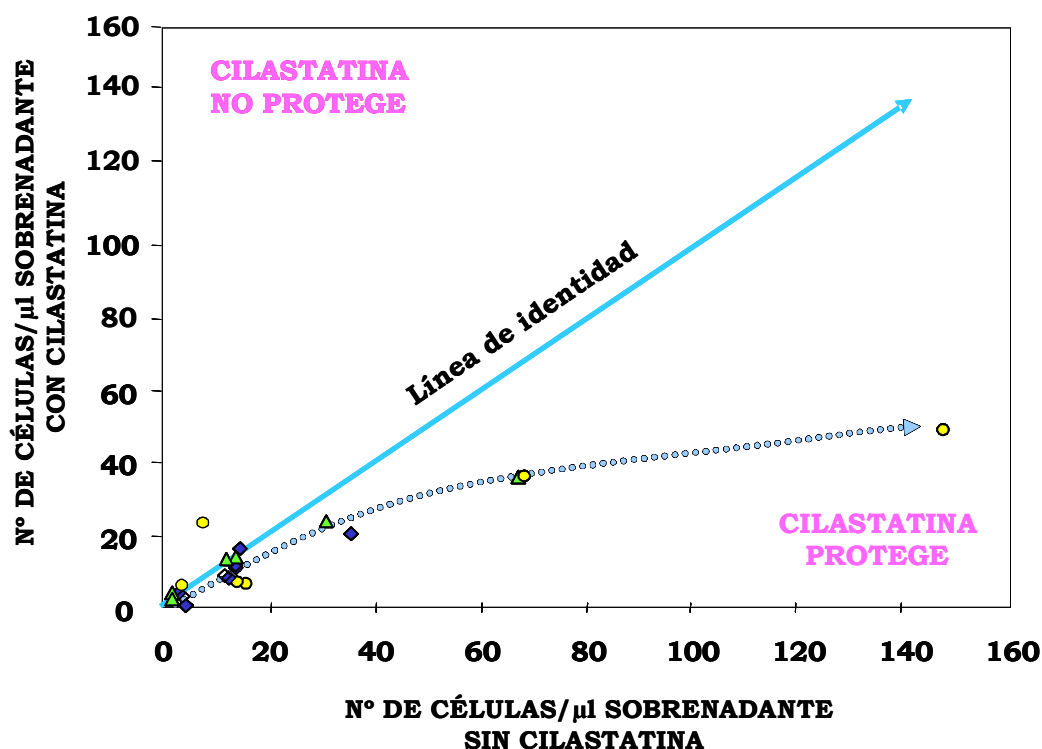
En la siguiente figura puede verse la cuantificación de las células desprendidas al sobrenadante con dosis progresivas de cuatro nefrotóxicos y la reducción en las mismas inducida por la coincubación con cilastatina (Fig. 27).



**FIGURA 27. Cuantificación de la muerte celular detectada en el sobrenadante por citometría de flujo. Efecto de cilastatina.** Las células fueron tratadas con los fármacos ± cilastatina (200 µg/ml) durante 24 horas. La presencia de cilastatina disminuyó la muerte celular inducida por vancomicina y cisplatino, pero no tuvo efecto en la inducida por paracetamol. Los datos se representan como la media ± EEM de 3 experimentos diferentes. ANOVA para medidas repetidas: efecto global de cilastatina  $p = 0.012$ . Análisis Post hoc: efecto de cilastatina sobre cada fármaco \*  $p < 0.05$ . SN = sobrenadante.

Se hizo patente la disminución por cilastatina del número de células desprendidas al medio sobrenadante de los cultivos tratados con distintas dosis de vancomicina, gentamicina y cisplatino. No se observaron diferencias con paracetamol, droga en la que el fenómeno de anoikis no parece formar parte del cuadro de fracaso renal.

En la representación gráfica que sigue, se presentan todos los valores correspondientes a los recuentos de células en el medio de cultivo sobrenadante de todas las condiciones y dosis ensayadas, representando en el eje de abscisas las incubaciones sin cilastatina y en ordenadas las incubaciones con cilastatina para las mismas condiciones ensayadas de fármacos y dosis. Si cilastatina no tuviese ningún efecto protector, las células desprendidas por anoikis en ambos ejes serían semejantes, y los puntos caerían todos dibujando la línea de identidad. Puede verse que para todas las condiciones, tóxicos y dosis ensayadas los puntos caen en la zona de protección (Fig. 28).



**FIGURA 28.** Representación gráfica correspondiente a la cuantificación del número de células/µl de medio de cultivo sobrenadante en presencia y ausencia de cilastatina. Las células fueron tratadas con los fármacos: vancomicina  $\blacktriangle$ , gentamicina  $\blacktriangle$  y cisplatino  $\bullet$  durante 24 horas. En esta representación se observa el efecto protector de cilastatina (200 µg/ml). Si éste fuera inexistente la distribución de los puntos se agruparía en torno a la línea de identidad.

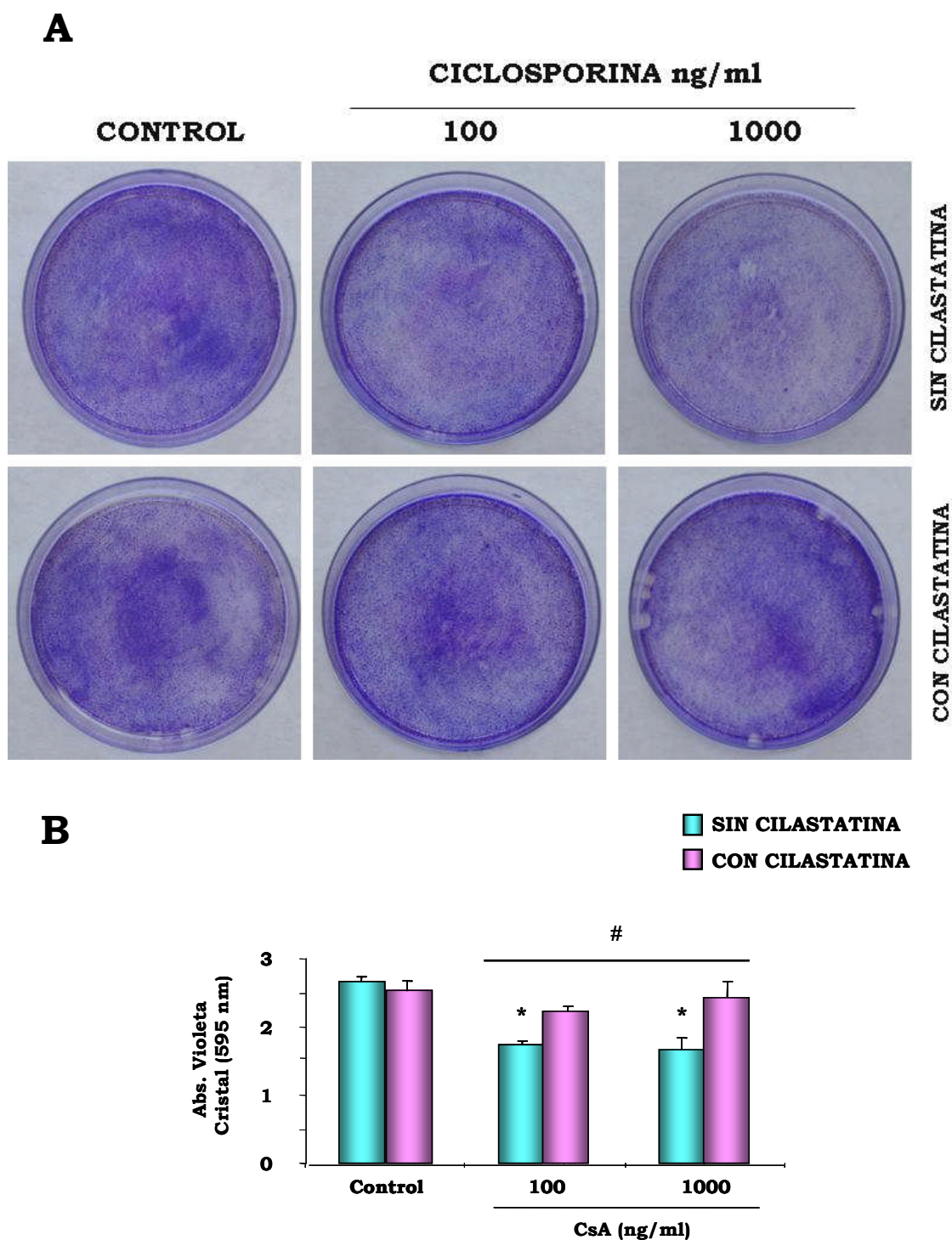


### **3.4.- CILASTATINA MEJORA LA CAPACIDAD REGENERATIVA CELULAR TRAS LA AGRESIÓN PRODUCIDA POR LOS NEFROTÓXICOS. EFECTOS EN LA VIABILIDAD CELULAR**

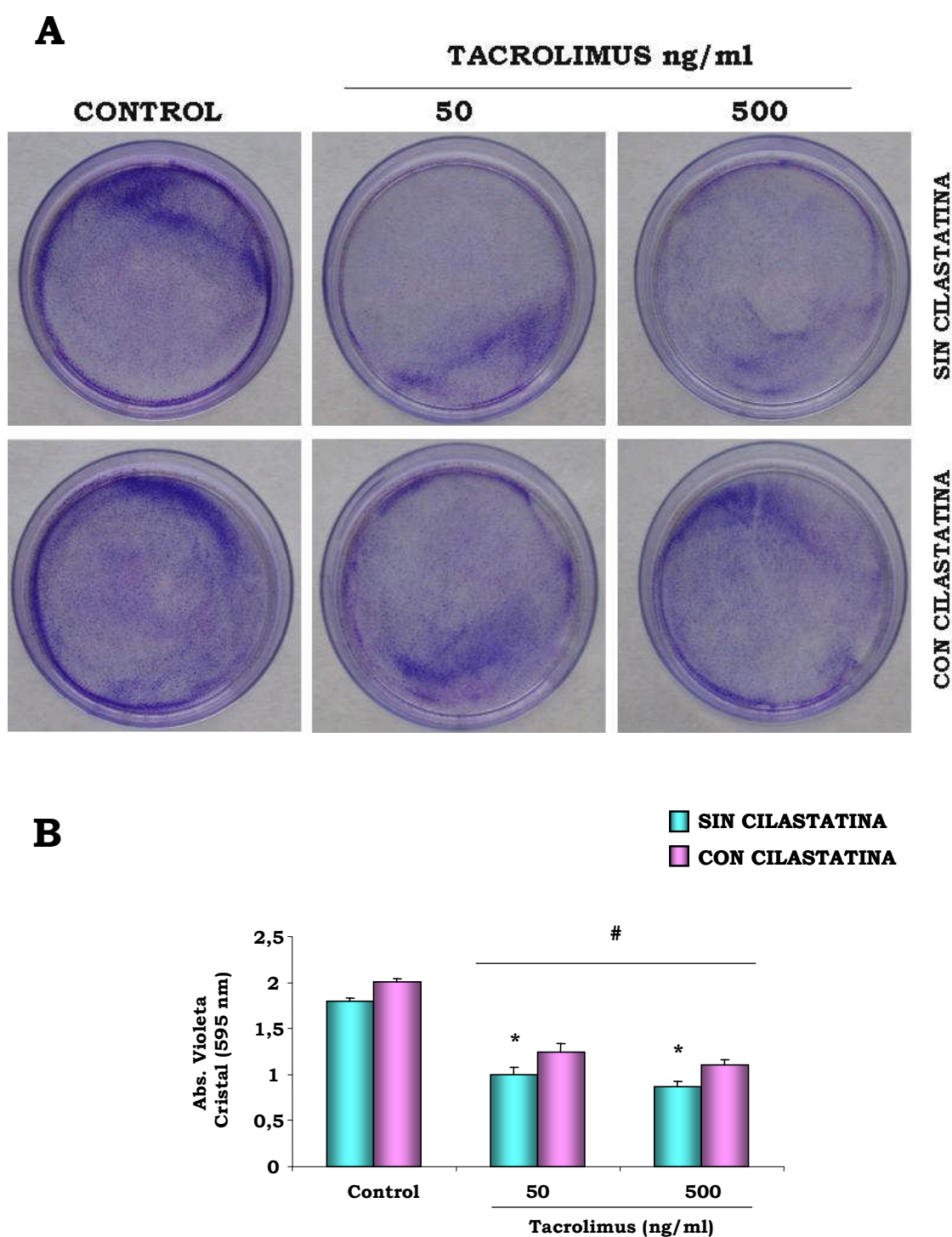
#### ***3.4.1.- Efecto de cilastatina sobre el número de unidades formadoras de colonias tras la agresión de los distintos tóxicos***

Para confirmar estos datos, se estudió la capacidad regenerativa celular tras agresión, determinando el número de unidades formadoras de colonias mediante la tinción con violeta cristal, un colorante que requiere integridad celular para ser incorporado a las células. Esta técnica tiene la ventaja de permitir visualizar macroscópicamente la intensidad de la agresión, así como tener una cuantificación de la misma mediante la determinación espectrofotométrica del colorante.

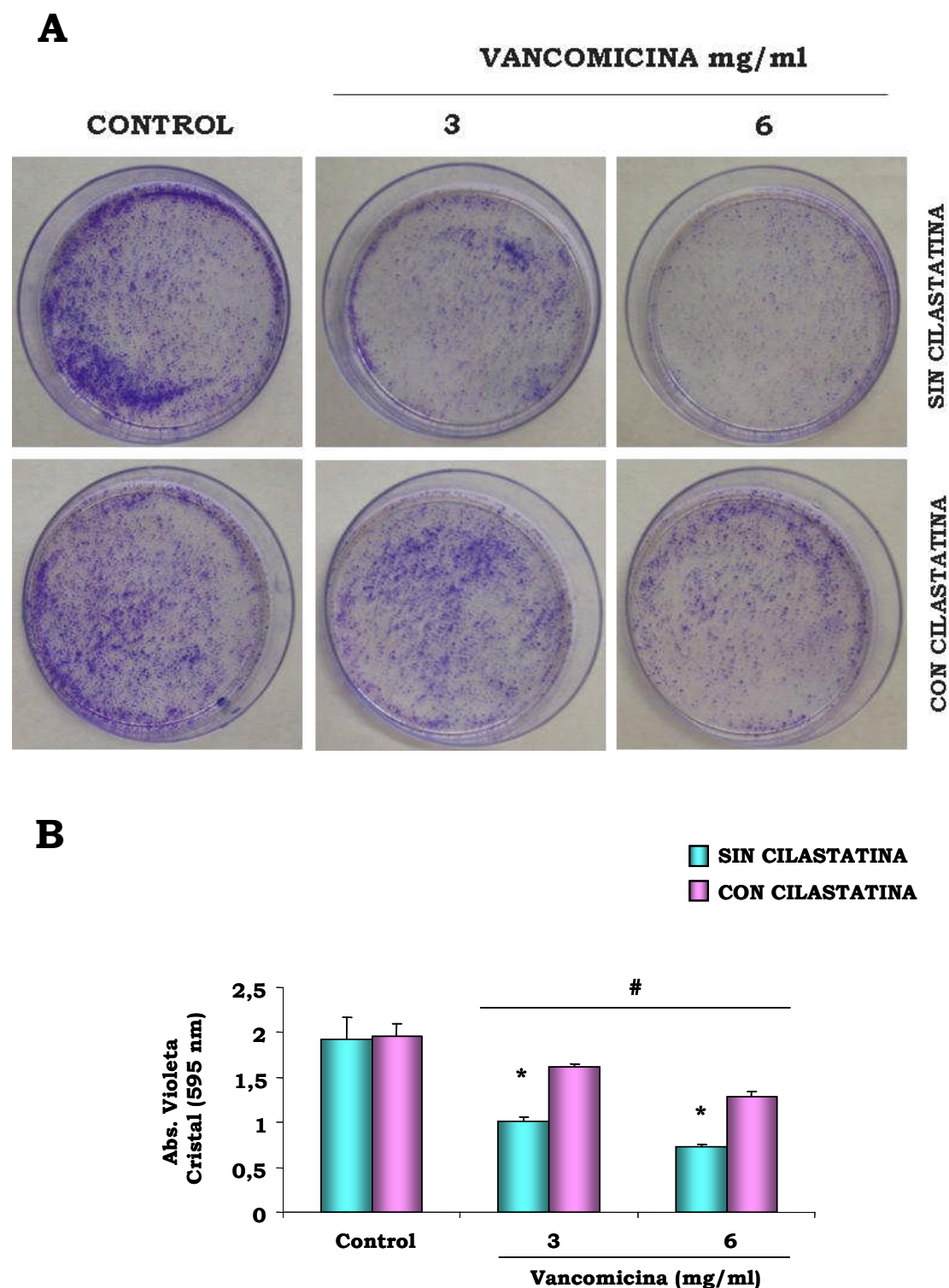
En las siguientes figuras se muestra la determinación de unidades formadoras de colonias supervivientes tras 24 horas de agresión con dosis crecientes de los distintos nefrotóxicos estudiados, en ausencia o en presencia de cilastatina. En la parte superior, placas de petri con la tinción. Las unidades formadoras de colonias se identifican por la densidad del punteado violeta. En la parte inferior de cada figura, el color de cada placa es cuantificado espectrofotométricamente tras la elución del colorante. Se presentan los resultados obtenidos en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml) y CsA (Fig. 29), tacrolimus (Fig. 30), vancomicina (Fig. 31), gentamicina (Fig. 32), cisplatino (Fig. 33) y paracetamol (Fig. 34) a las dosis indicadas. En todos los casos, cilastatina aumentó de modo significativo el número de unidades formadoras de colonias proximales tras la agresión del nefrotóxico. Estos resultados confirman que la coincubación con cilastatina restaura total o parcialmente el crecimiento celular inhibido por los nefrotóxicos.



**FIGURA 29. Ensayo de formación de colonias de células tubulares proximales.** **A.** Imágenes representativas de la tinción con cristal violeta de las unidades formadoras de colonias supervivientes de células del túbulo proximal tras 24 horas de tratamiento con CsA (100 ng/ml y 1000 ng/ml) ± cilastatina (200 µg/ml). **B.** Tras la elución del colorante se determinó la absorbancia a 595 nm. Los datos se representan como la media ± EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  vs. tratamiento + cilastatina, #  $p < 0.05$  vs. control ± cilastatina.

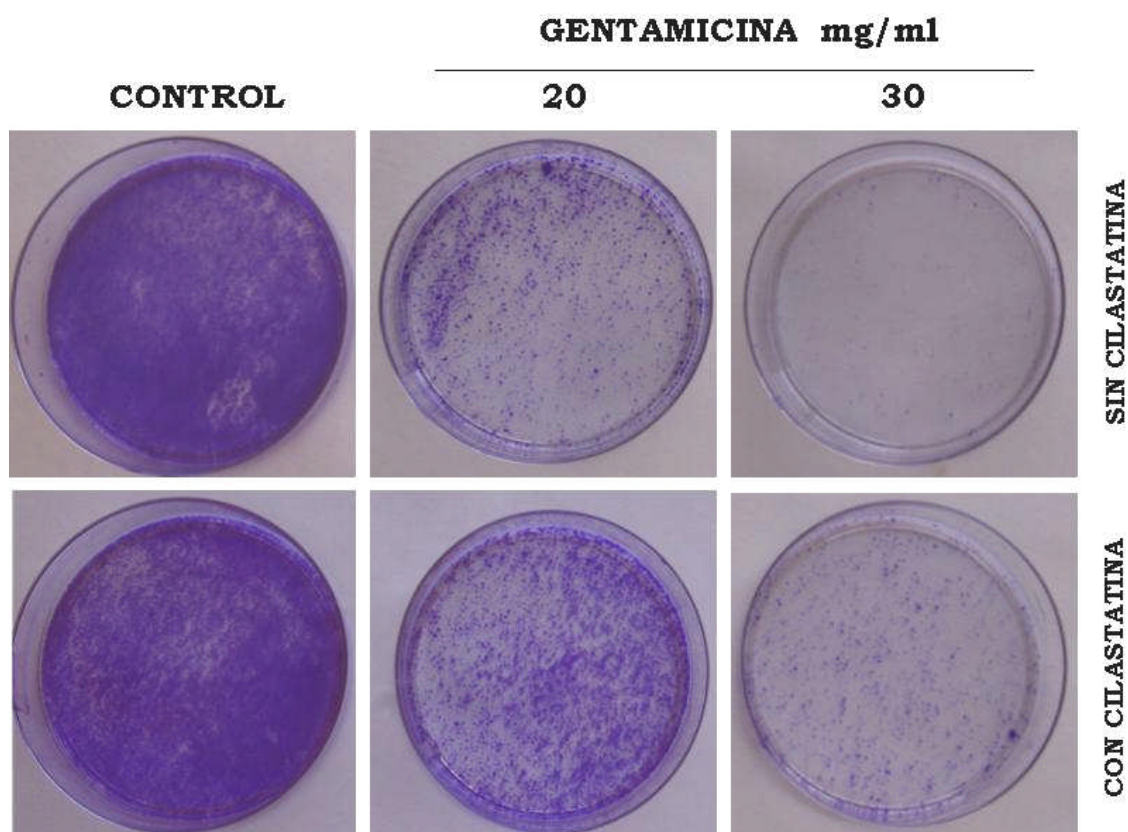
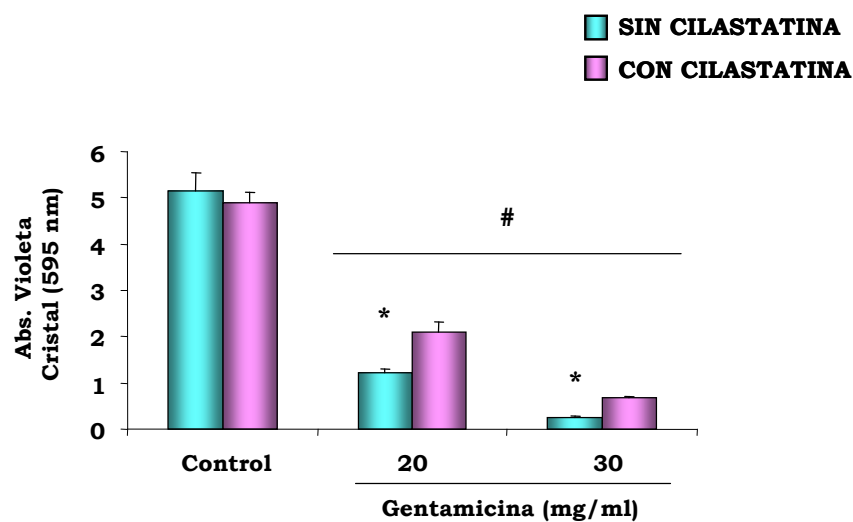


**FIGURA 30. Ensayo de formación de colonias de células tubulares proximales. A.** Imágenes representativas de la tinción con cristal violeta de las unidades formadoras de colonias supervivientes de células del túbulo proximal tras 24 horas de tratamiento con tacrolimus (50 ng/ml y 500 ng/ml) ± cilastatina (200 µg/ml). **B.** Tras la elución del colorante se determinó la absorbancia a 595 nm. Los datos se representan como la media ± EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  vs. tratamiento + cilastatina, #  $p < 0.05$  vs. control ± cilastatina.



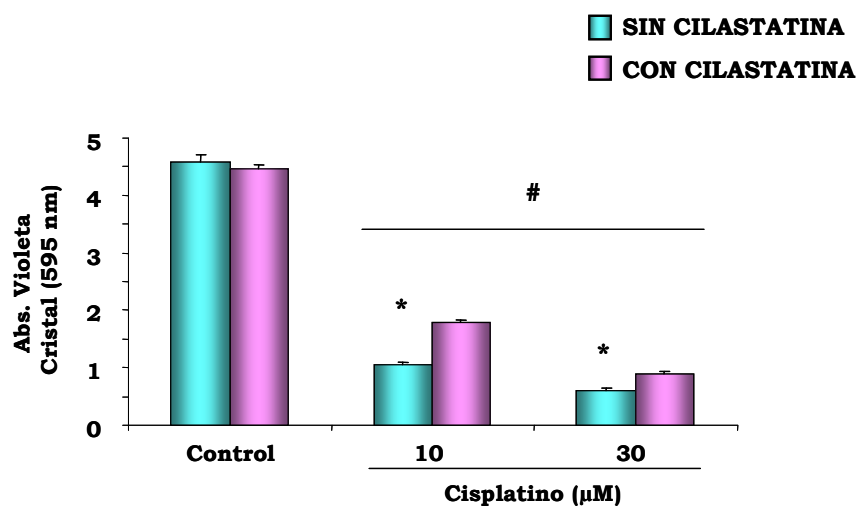
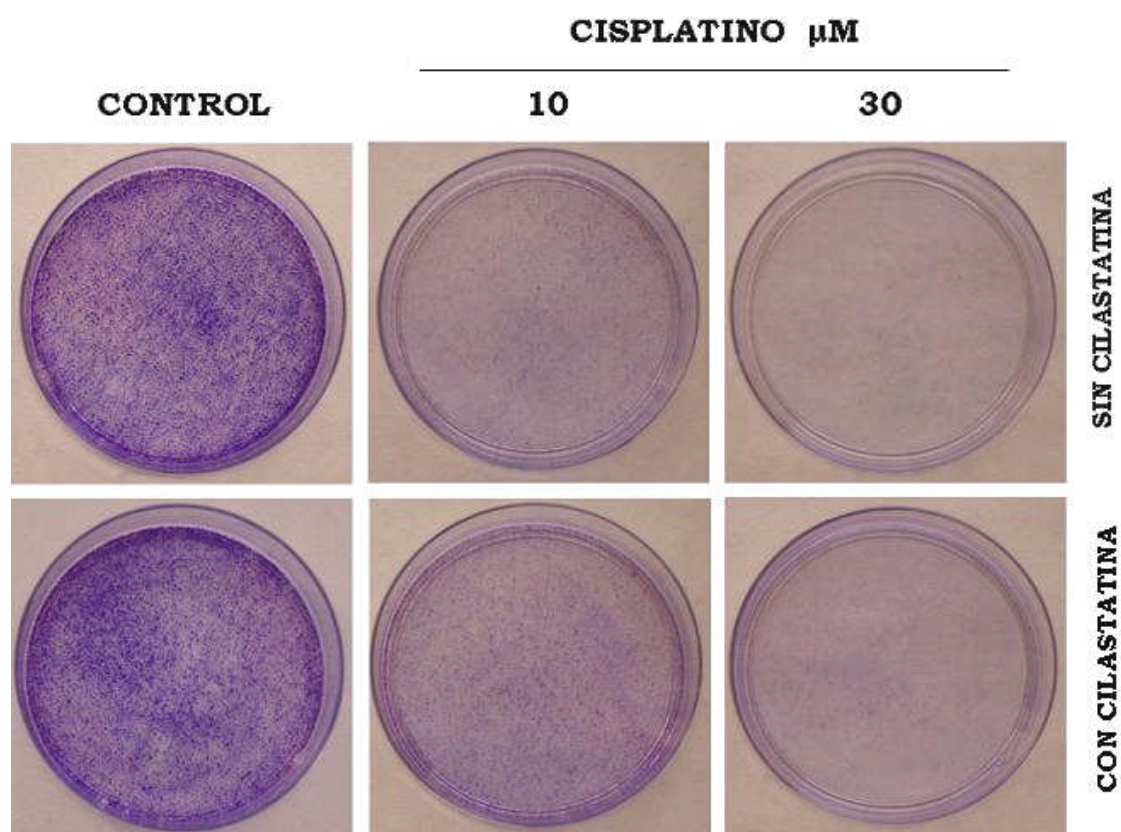
**FIGURA 31. Ensayo de formación de colonias de células tubulares proximales. A.** Imágenes representativas de la tinción con cristal violeta de las unidades formadoras de colonias supervivientes de células del túbulo proximal tras 24 horas de tratamiento con vancomicina (3 mg/ml y 6 mg/ml) ± cilastatina (200 µg/ml). **B.** Tras la elución del colorante se determinó la absorbancia a 595 nm. Los datos se representan como la media ± EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  vs. tratamiento + cilastatina, #  $p < 0.05$  vs. control ± cilastatina.



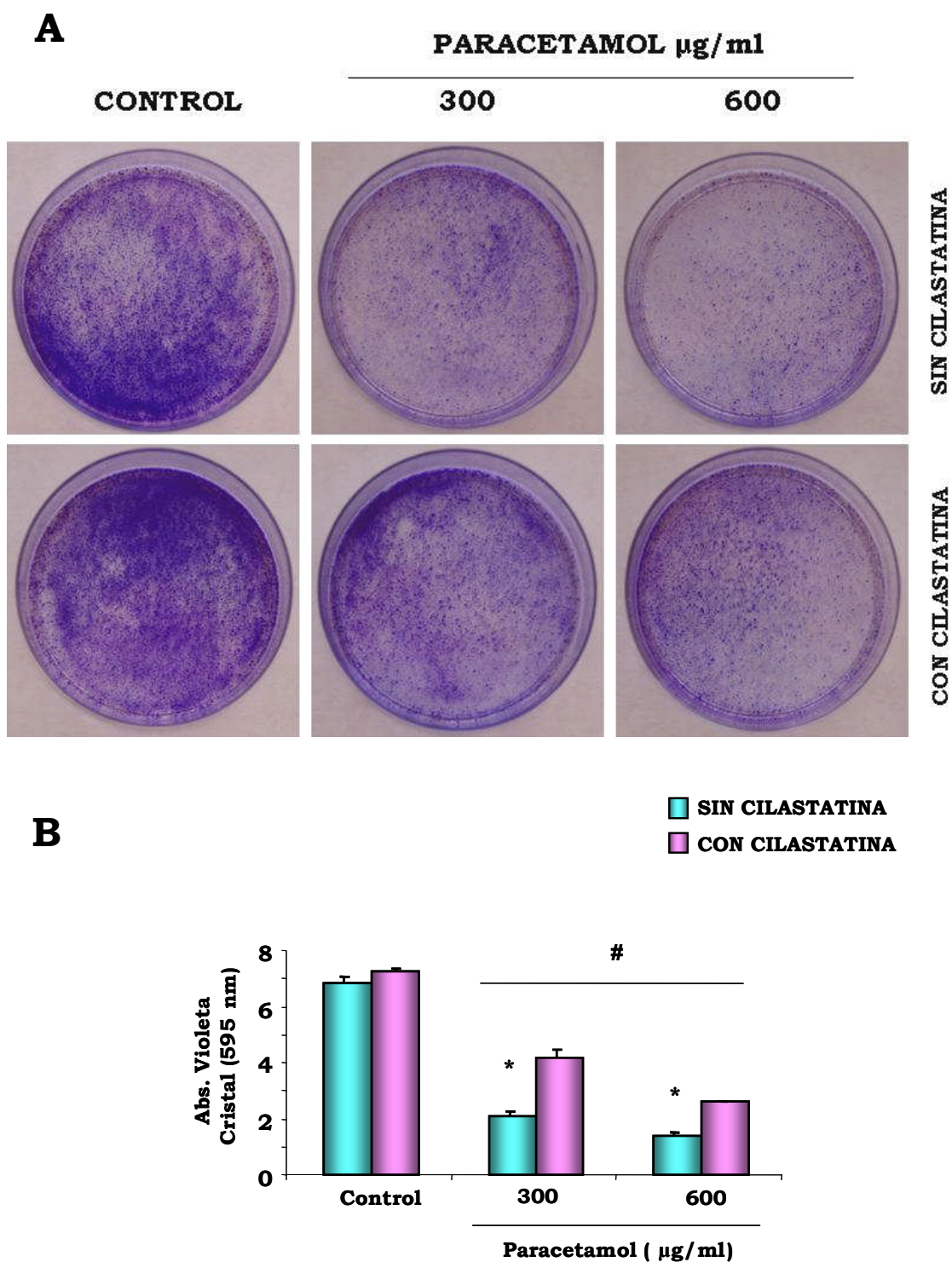
**A****B**

**FIGURA 32. Ensayo de formación de colonias de células tubulares proximales. A.** Imágenes representativas de la tinción con cristal violeta de las unidades formadoras de colonias supervivientes de células del túbulo proximal tras 24 horas de tratamiento con gentamicina (20 mg/ml y 30 mg/ml) ± cilastatina (200 µg/ml). **B.** Tras la elución del colorante se determinó la absorbancia a 595 nm. Los datos se representan como la media ± EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  vs. tratamiento + cilastatina, #  $p < 0.05$  vs. control ± cilastatina.

A



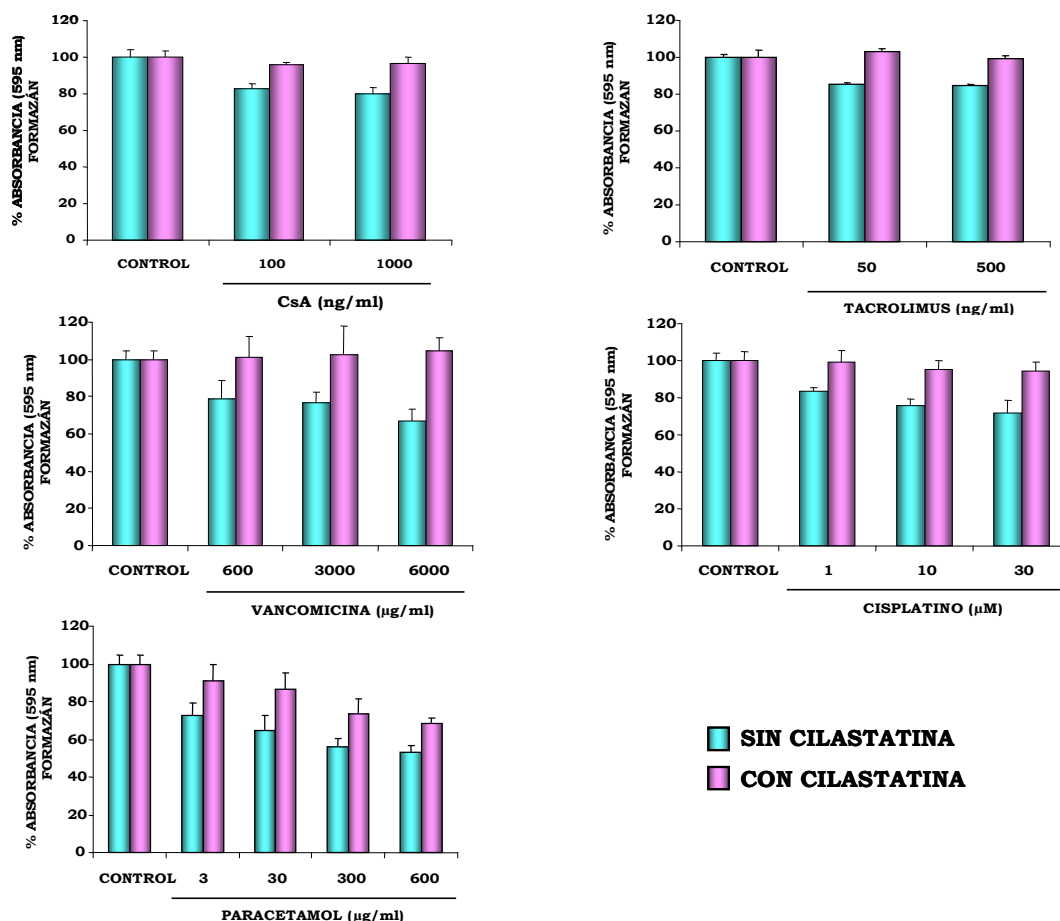
**FIGURA 33. Ensayo de formación de colonias de células tubulares proximales.** **A.** Imágenes representativas de la tinción con cristal violeta de las unidades formadoras de colonias supervivientes de células del túbulo proximal tras 24 horas de tratamiento con cisplatino (10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ )  $\pm$  cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ). **B.** Tras la elución del colorante se determinó la absorbancia a 595 nm. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  vs. tratamiento + cilastatina, #  $p < 0.05$  vs. control  $\pm$  cilastatina.



**FIGURA 34. Ensayo de formación de colonias de células tubulares proximales.** **A.** Imágenes representativas de la tinción con cristal violeta de las unidades formadoras de colonias supervivientes de células del túbulo proximal tras 24 horas de tratamiento con paracetamol (300  $\mu\text{g/ml}$  y 600  $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$  cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ). **B.** Tras la elución del colorante se determinó la absorbancia a 595 nm. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  vs. tratamiento + cilastatina, #  $p < 0.05$  vs. control  $\pm$  cilastatina.

### 3.4.2.- Cilastatina restaura la capacidad oxidativa mitocondrial del túbulo proximal. Ensayo de viabilidad celular

Para detectar los cambios funcionales existentes tras esta aparente protección por cilastatina de la capacidad regenerativa celular tras una agresión nefrotóxica, estudiamos la capacidad oxidativa de las cadenas mitocondriales de las células supervivientes, mediante la determinación de la reducción del MTT a formazán. Tras 24 horas de incubación con dosis progresivas de los fármacos pudo observarse la interferencia dosis-dependiente de estos con la viabilidad celular de los cultivos medida en términos de aparición de azul de formazán (Fig. 35). La coincubación de CsA, tacrolimus, cisplatino y vancomicina con cilastatina mostró niveles de aparición de azul de formazán semejantes a los del control. En el paracetamol, la restauración fue parcial. Estos ensayos también se aplicaron a gentamicina, pero no se obtuvieron resultados por la interacción de ésta con el espectro de absorción del formazán.



**FIGURA 35. Reducción del MTT a azul de formazán por la cadena mitocondrial en las células del túbulo proximal.** Cilastatina (200 µg/ml) mejoró la función mitocondrial de manera total, alcanzando niveles semejantes al control en las células tratadas con CsA, tacrolimus, vancomicina y cisplatino durante 24 horas. En paracetamol la recuperación fue parcial. Los datos representan la media ± EEM de 4 experimentos. ANOVA: para CsA: efecto dosis  $p = 0.05$ , efecto "cilastatina"  $p = 0.09$ , efecto "interacción" no significativo (ns); para tacrolimus: efecto dosis  $p = 0.041$ , efecto "cilastatina"  $p = 0.035$ , efecto "interacción"  $p = 0.079$ ; para cisplatino: efecto dosis  $p = 0.038$ , efecto "cilastatina"  $p = 0.001$  y efecto "interacción" ns; para vancomicina: dosis ns, efecto "cilastatina"  $p = 0.025$  efecto "interacción" ns; para paracetamol: efecto dosis  $p = 0.05$ , efecto "cilastatina" ns y efecto "interacción" ns.



## **4.- CILASTATINA PROTEGE DE LA NEFROTOXICIDAD EJERCIDA POR LOS FÁRMACOS, AL INTERFERIR CON SU TRANSPORTE AL INTERIOR CELULAR**

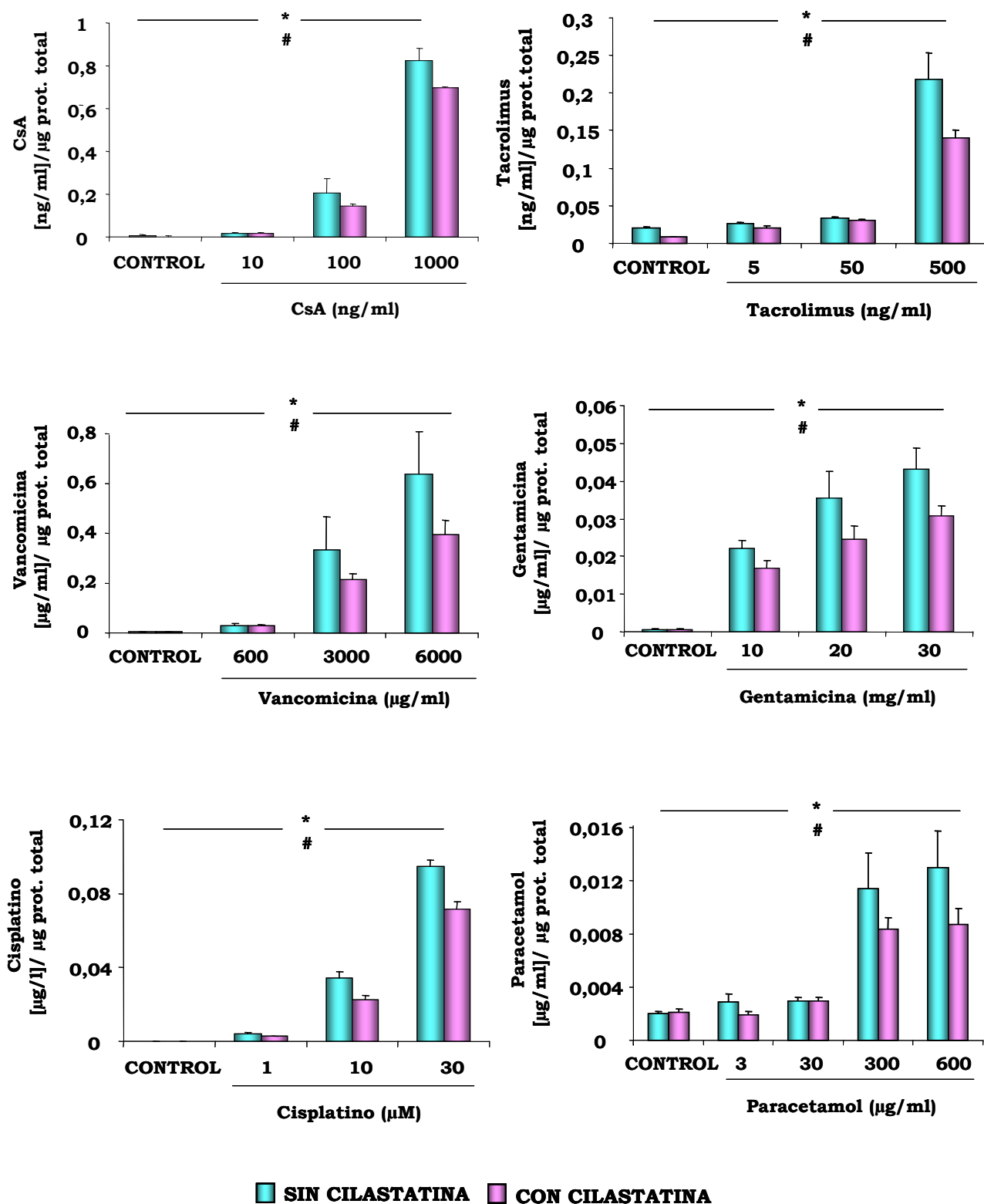
### **4.1.- DISMINUCIÓN DE LA ENTRADA DE FÁRMACOS AL INTERIOR CELULAR**

Como se ha podido comprobar desde los primeros experimentos, cilastatina reduce la muerte celular inducida por todos los fármacos ensayados, y limita los procesos estudiados asociados a apoptosis (transferencia electrónica mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo C, activación de endonucleasas, generación de cuerpos apoptóticos y anoikis). Esto unido al hecho de que la protección parecía ser mayor a medida que la dosis del tóxico aumentaba, nos llevó a pensar que tal vez cilastatina ejerciera su efecto protector al interferir con el transporte de los nefrotóxicos al interior de las CTP.

Para comprobarlo se cuantificaron las concentraciones intracelulares de todos los tóxicos mediante TDX menos la de cisplatino, que se realizó por ICP-MS. Las CTP fueron tratadas durante 24 horas con los distintos fármacos y sus distintas dosis en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml).

Los resultados obtenidos con CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina, cisplatino y paracetamol se muestran en la figura 36, en la que puede observarse como a medida que aumenta la concentración del tóxico, aumenta la concentración intracelular cuantificada. Cuando se coadministra el tóxico con cilastatina se observa una disminución significativa de la concentración intracelular para todos los casos (Fig. 36).

De acuerdo con estos resultados, que indican que cilastatina interfiere con la acumulación intracelular de todos los nefrotóxicos estudiados, cilastatina parece capaz de inhibir una vía de entrada de nefrotóxicos al interior celular no conocida como tal hasta ahora, como resultado de su unión a la DHP-I.



**FIGURA 36. Efecto de cilastatina en la acumulación intracelular de nefrotóxicos.** Mediante TDX e ICP – MS se determinó la concentración intracelular de los tóxicos. Las células del túbulo proximal fueron tratadas con los fármacos en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml) durante 24 horas. El cotratamiento con cilastatina disminuyó notablemente la concentración intracelular de todos los tóxicos estudiados, encontrando una reducción de la concentración más notable en las dosis altas de todos los experimentos. Los datos se representan como la media ± EEM de 3 experimentos diferentes. ANOVA: \* efecto cilastatina  $p < 0.05$  y # efecto dosis  $p < 0.05$ .

#### **4.2.- REDUCCIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE LAS BALSAS DE COLESTEROL MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE CILASTATINA CON LA DHP-I**

La posibilidad de que cilastatina interfiera con el transporte de los nefrotóxicos al interior celular, unido al hecho de que DHP-I se encuentra ligada a las BDC del borde en cepillo <sup>125</sup>, planteaba la posibilidad de que el modo de acción de cilastatina estuviese de algún modo relacionado con dichas BDC. De ser cierto, implicaría que las BDC jugarían a su vez un papel mayor y hasta ahora insospechado en la nefrotoxicidad sobre el túbulo proximal.

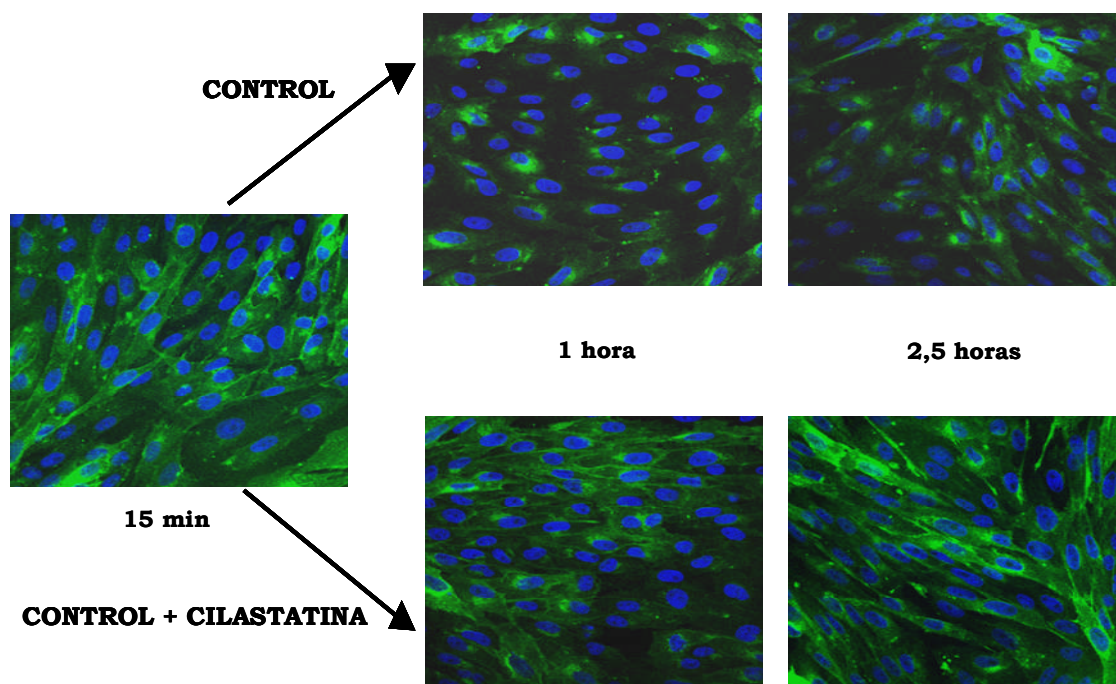
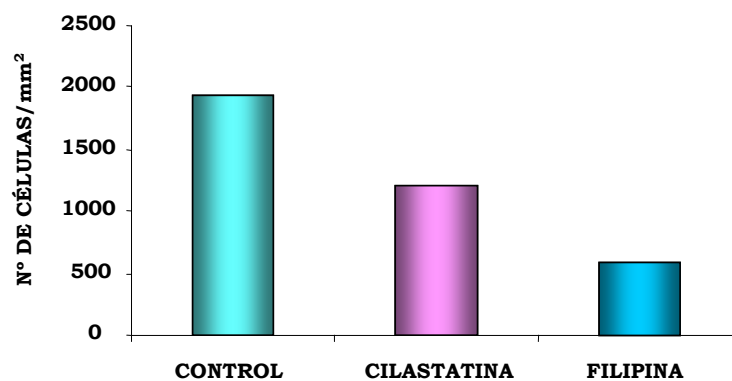
Para profundizar en la interacción de cilastatina con las BDC se planteó un ensayo para demostrar si cilastatina podría bloquear el transporte a través de estas o interferir con la ruta endocítica dependiente de las mismas.

Para marcar las caveolas en las CTP y poder seguir su localización celular a lo largo del tiempo por microscopia confocal, se marcó el receptor de la toxina B colérica, presente en las caveolas, con su ligando (toxina B colérica) marcado con un fluoróforo (FITC) (10 µg/ml), y se siguió su migración intracelular a lo largo del tiempo mediante microscopía confocal.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 37A. Los núcleos celulares están teñidos con DAPI (5 µg/ml) y marcados en azul. La tinción verde fluorescente corresponde al marcaje del receptor de la toxina B. Puede observarse como a los 15 minutos de incubación con el fluorólogo, la tinción se distribuye en las membranas celulares de las CTP, dando una tinción lineal pericelular (Fig. 37A).

En la parte superior de la imagen, se muestra la distribución de la fluorescencia en las CTP en ausencia de cilastatina. Tras 1 hora de incubación con la toxina B, el marcaje comienza a acumularse en posición perinuclear, en la región correspondiente al aparato de Golgi. A las 2,5 horas, la tinción del Golgi se mantiene, y ya no aparece tinción en las membranas celulares. Sin embargo, en la parte inferior de la figura puede verse que en presencia de cilastatina al cabo de 1 y 2.5 horas, el marcaje se mantiene en membrana de las CTP, lo que quiere decir que las caveolas marcadas no se han movido de la membrana celular.

En la Figura 37B se presenta la reducción observable en el marcaje en el aparato de Golgi a las 2.5 horas de haber marcado las caveolas de la membrana celular con toxina B fluorescente, en presencia de cilastatina (200 µg/ml) o de filipina (50 µg/ml). El secuestro de las caveolas con filipina impide la internalización de las mismas, ya que causa muerte celular en poco tiempo. Cilastatina también impide la localización en el aparato de Golgi del marcaje de las caveolas, sin alterar su viabilidad (Fig. 37B).

**A****B**

**FIGURA 37. Reducción de la internalización de toxina B colérica en las balsas de colesterol por cilastatina.**

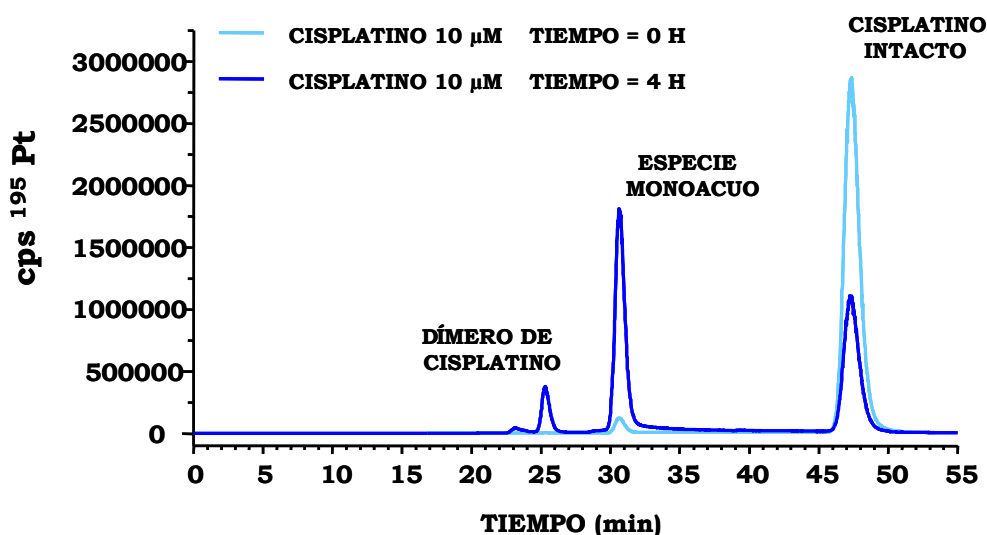
**A.** La distribución del marcaje fluorescente varía en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/ml) seguida por microscopía confocal. Los núcleos aparecen marcados en azul al ser teñidos con DAPI (5 µg/ml). En el control, la tinción con toxina B-FICT (10 µg/ml) pasa de una distribución inicial en las membranas celulares a mostrar un marcaje perinuclear, en el aparato de Golgi, pasadas 2.5 horas de incubación con el fluorólogo. Sin embargo, en presencia de cilastatina la distribución inicial en las membranas se mantiene a lo largo del tiempo.

**B.** Cuantificación del número de células por mm<sup>2</sup> de las imágenes tomadas por microscopía confocal que presentan la tinción de la toxina B-FICT en el aparato de Golgi a las 2.5 horas de incubación. Tanto cilastatina como filipina (50 µg/ml) inhiben la internalización de las caveolas marcadas con la toxina B-FICT.

## 5.- ESPECIACIÓN DE CISPLATINO

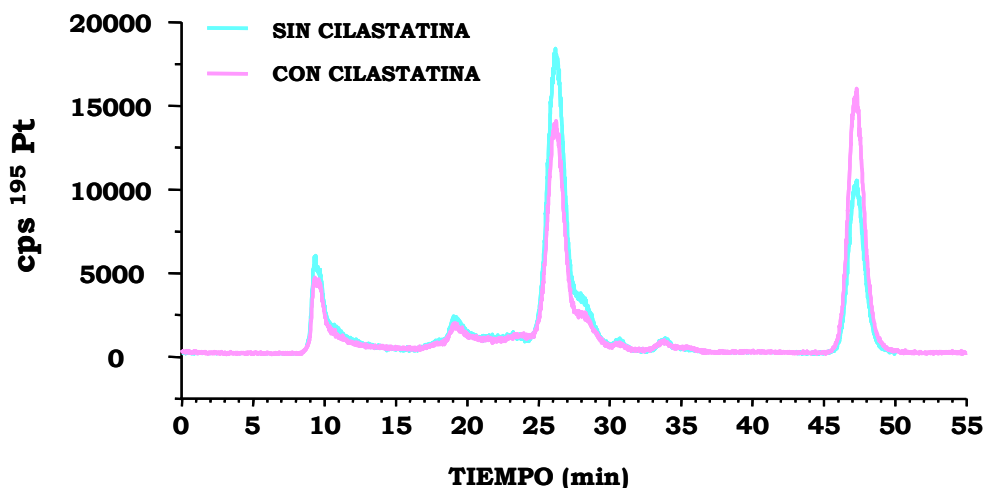
El análisis de especiación de fármacos basados en platino como es el cisplatino, es fundamental para conocer su comportamiento y las interacciones con diferentes biomoléculas (ADN, ARN, fosfolípidos de membrana, proteínas citosólicas, etc), que son finalmente responsables de los efectos adversos como la nefrotoxicidad.

En la figura 38 puede observarse la distribución normal de las especies de platino que se generan a lo largo del tiempo (0 y 4 horas). Inicialmente (a los 48 minutos) aparece casi un único pico que corresponde a cisplatino intacto (libre), ya que no le ha dado tiempo todavía a distribuirse. Sin embargo, tras 4 horas de incubación éste decrece su intensidad de forma significativa (Fig. 38) apareciendo claramente dos nuevas especies como son el monoacuoplatino a los 31 minutos y el diacuoplatino o dímero de cisplatino entre los 20 y los 25 minutos.



**FIGURA 38. Cromatograma de la especiación temporal de cisplatino obtenido por SEC-ICP-MS.** Representación de la distribución normal de las especies iónicas de cisplatino (10 µM) a 0 y 4 horas de incubación.

Al tratar los cultivos de CTP con cisplatino (10  $\mu$ M) y cisplatino (10  $\mu$ M) con cilastatina (200  $\mu$ g/ml), el cromatograma obtenido se presenta en la siguiente figura (Fig. 39):



**FIGURA 39. Cromatograma de la especiación de cisplatino en extractos citosólicos de células del túbulo proximal.** Representación de especies iónicas de cisplatino obtenidas de los cultivos tratados 24 horas con cisplatino (10  $\mu$ M) y cisplatino + cilastatina (200  $\mu$ g/ml) por SEC-ICP-MS.

Puede observarse cómo en primer lugar el tratamiento con cilastatina en el medio no altera la presencia de las especies del platino *versus* su ausencia, ya que aparecen exactamente los mismos picos con intensidades muy similares. Además, en ambos casos la forma monoacuoplatino ha desaparecido estando la mayor parte del cisplatino como dímero de cisplatino, mientras que aparece un pico final a los 10 minutos que representa otra especie diferente (o especies) derivada del cisplatino, representando una buena reactividad del mismo con la fracción citosólica celular.

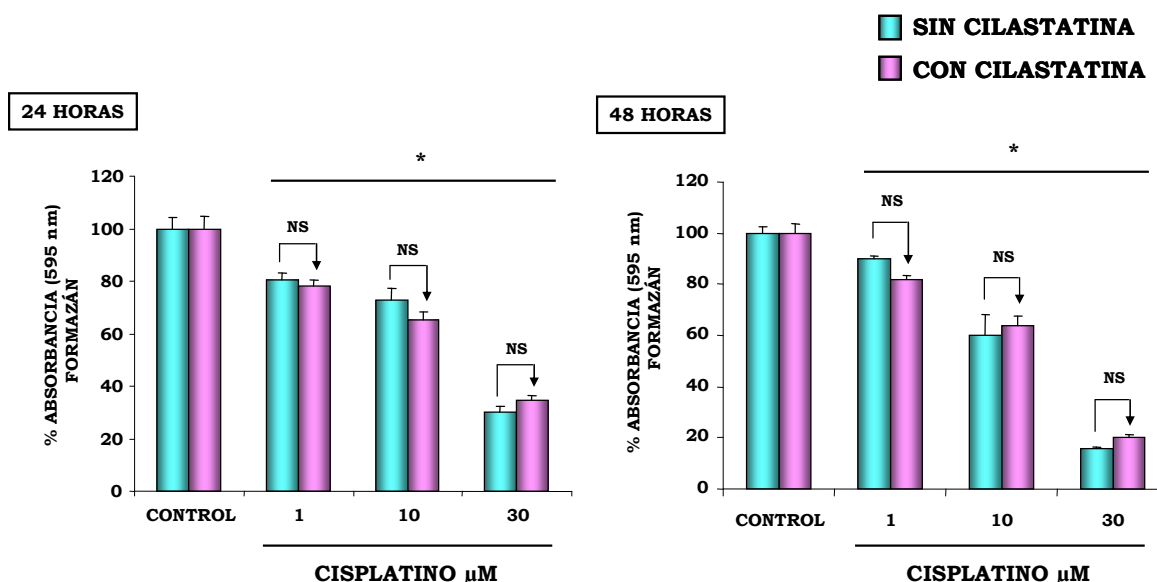
Por tanto, la protección ejercida por cilastatina frente a la toxicidad de cisplatino, no afecta o altera “intracelularmente” a la forma de distribución, eliminación, almacenaje o más específicamente la actividad intracelular del cisplatino, ya que ésta es idéntica tanto en su presencia como en su ausencia.

## 6.- EL EFECTO NEFROPROTECTOR DE CILASTATINA ES ESPECÍFICO DEL TÚBULO PROXIMAL

### 6.1.- CILASTATINA Y CÉLULAS HELA

Uno de los fármacos en los que resulta más crítico discernir si la nefroprotección ofrecida por cilastatina de cara a un posible uso clínico, se acompaña o no de reducción en la potencia del fármaco es el cisplatino. Para establecer que en presencia de cilastatina el cisplatino no perdía actividad citotóxica antitumoral, se ensayó el fármaco sobre una línea de células tumorales, células HeLa (diana del cisplatino), cuantificando el efecto de cisplatino sobre la actividad mitocondrial mediante la reducción de MTT a azul de formazán (Fig. 40).

El procedimiento se llevó a cabo en células HeLa a 24 y 48 horas, con diferentes dosis de cisplatino (1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ ). En la figura 40, puede observarse como cilastatina no impide la acción quimioterapéutica del cisplatino en células cancerígenas.



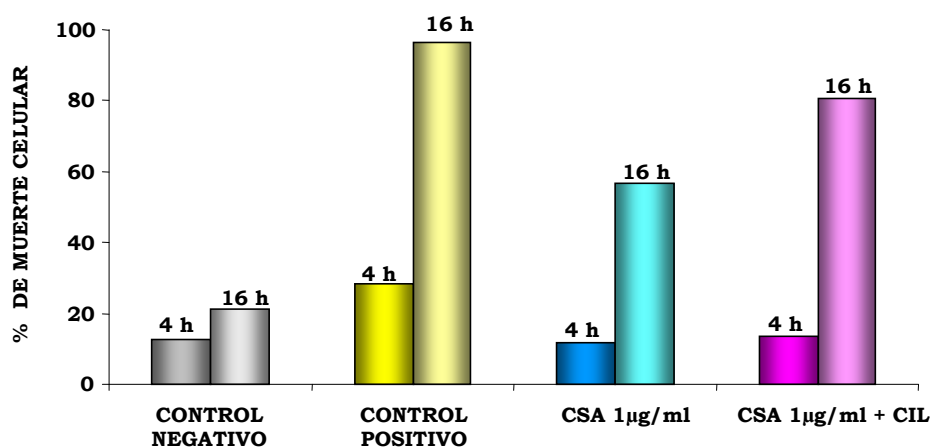
**FIGURA 40. Acción de cilastatina sobre el efecto del cisplatino en la actividad mitocondrial de células tumorales HeLa.** Se estudia la reducción de MTT a azul de formazán, cuantificando los valores de absorbancia de éste a 595 nm, tras 24 ó 48 horas de incubación con el fármaco. Control: células sin tratamiento, cisplatino: células incubadas con cisplatino a concentraciones de 1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ . Cada uno de los tratamientos, se llevó a cabo en ausencia y presencia de cilastatina (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. ANOVA: NS efecto cilastatina no significativo, \*  $p < 0.05$  vs. control  $\pm$  cilastatina.

## 6.2.- CILASTATINA Y LINFOCITOS

En la revisión bibliográfica realizada no se ha encontrado que cilastatina inhiba o disminuya la acción de inmunosupresores en sus células diana, los linfocitos. De hecho, en los estudios experimentales realizados por Hammer <sup>69</sup>, los riñones trasplantados de los animales tratados con CsA y cilastatina presentaron mejor función renal al finalizar el estudio. Sin embargo, hemos querido valorar la posible interacción de cilastatina en linfocitos (CD3+ aislados de sangre periférica de donantes sanos) tratados con inmunosupresores nefrotóxicos mediante la cuantificación de su muerte celular por apoptosis.

Las células se trataron con diferentes dosis de CsA, con camptotecina (50 µg/ml) (“control positivo”) y en ausencia de tratamiento (“control negativo”), a diferentes tiempos de incubación en presencia y ausencia de cilastatina. Se determinó la muerte celular mediante citometría de flujo utilizando Anexina-V como marcador de apoptosis.

La figura 41 muestra el curso temporal del aumento del porcentaje de muerte celular producida por CsA (1 µg/ml) en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/ml) tras 4 y 16 horas de incubación. Puede observar que a las 16 horas de tratamiento se encuentra apoptosis, mientras que a 4 horas todavía no (Fig. 41).

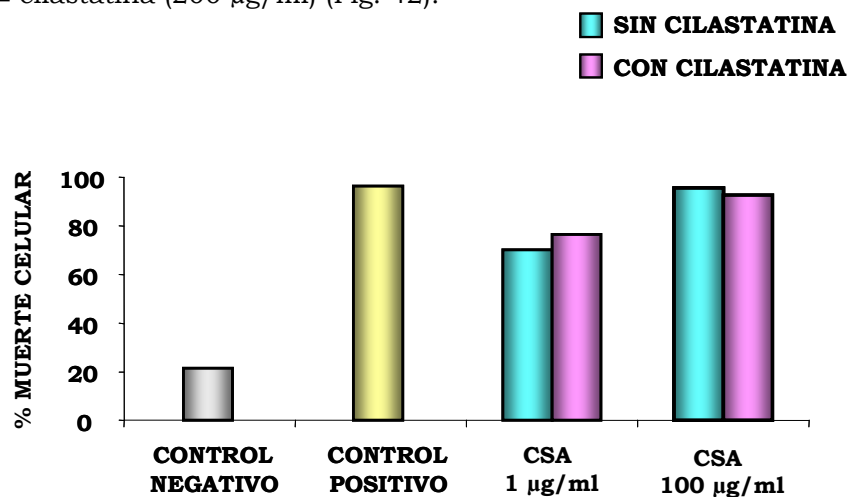


**FIGURA 41. Curso temporal del aumento del porcentaje de muerte celular de linfocitos T.** Linfocitos no tratados (control negativo), tratados con camptotecina (50 µg/ml), CsA 1 µg/ml ± cilastatina (200 µg/ml) tras 4 o 16 horas de incubación.

En general puede observarse tanto el efecto dosis-respuesta de CsA sobre linfocitos T, como la ausencia del efecto protector de cilastatina. Por lo tanto, al comprobar que a las 16 horas había apoptosis, decidimos probar distintas dosis de CsA utilizando este tiempo de incubación.



La figura 42 muestra la ausencia del efecto protector de la cilastatina sobre la inducción de muerte celular producida por CsA a distintas dosis, mediante la representación del porcentaje de apoptosis observado en linfocitos sin tratamiento ("control negativo"), incubados con camptotecina ("control positivo") y con CsA (1 y 100  $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$  cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 42).



**FIGURA 42. Muerte celular en linfocitos T.** Las células fueron incubadas 16 horas sin tratamiento (control negativo), con camptotecina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (control positivo), y CsA (1 y 100  $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$  cilastatina (200  $\mu\text{g/ml}$ ). Cilastatina no redujo la muerte celular inducida por CsA.

Estos resultados en los que no se encuentran diferencias significativas en la cuantificación de apoptosis entre los linfocitos tratados con CsA y los linfocitos tratados con CsA y cilastatina, indican que cilastatina no interfiere en la acción de CsA sobre sus células diana.

## **VI.II.- *ESTUDIOS IN VIVO***

---

## 1.- MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*: PROTECCIÓN POR CILASTATINA FRENTE A LA NEFROTOXICIDAD DE CISPLATINO

Aparentemente, cilastatina parece capaz de reducir el transporte de un amplio número de nefrotóxicos hacia el interior de las CTP, lo que teóricamente cubre un abanico considerable de aplicaciones clínicas.

Sin embargo, en el FRA observado en el animal entero se producen fenómenos inflamatorios, oxidativos, y vasculares derivados del propio daño tubular que están evidentemente ausentes en los modelos *in vitro* sobre células en cultivo.

Así pues, parece crucial averiguar si la nefroprotección observada *in vitro* se traduce en una protección eficaz en el animal de laboratorio sometido a un modelo de nefrotoxicidad aguda, antes de plantearse el posible salto a su aplicación en clínica.

En esta tesis se recoge el primer modelo animal ensayado en el laboratorio tras el desarrollo *in vitro*. Tanto el desarrollo *in vitro* como el modelo animal se han incluido en la patente “Uso de la cilastatina para reducir la nefrotoxicidad de distintos compuestos” recientemente solicitada por el grupo, con número PCT/ES2008/070137.

El modelo inicialmente seleccionado y puesto en marcha fue el de nefrotoxicidad aguda por cisplatino sobre ratas Wistar.

### 1.1.- CILASTATINA REDUCE LA PÉRDIDA DE PESO PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO

En la tabla 10 se muestra el balance entre el peso que tuvieron los animales al final del estudio, y el peso con el que comenzaron el mismo. Puede observarse como los animales control y control más cilastatina aumentaron su peso medio unos 15 gramos aproximadamente, mientras que en los grupos tratados con cisplatino se produjo una pérdida significativa de peso en comparación con éstos ( $p < 0.0001$ ). Los animales que recibieron cisplatino y fueron tratados con cilastatina, perdieron significativamente ( $p < 0.05$ ) menos peso que los animales que fueron tratados sólo con el agente quimioterápico (Tabla 10).

**TABLA 10. Balance de peso corporal al final del estudio.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM,  $n = 6-8$  animales por grupo, \*  $p \leq 0.0001$  vs. control  $\pm$  cilastatina. #  $p \leq 0.05$  vs. cisplatino.

GRUPOS	PESO INICIAL	PESO FINAL	$\Delta$ PESO
CONTROL	264 $\pm$ 3	279 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1
CONTROL + CIL	259 $\pm$ 8	273 $\pm$ 7	14 $\pm$ 2
CISPLATINO	272 $\pm$ 4	249 $\pm$ 5	- 23 $\pm$ 3 *
CISPLATINO + CIL	272 $\pm$ 5	259 $\pm$ 3	-13 $\pm$ 4 *#

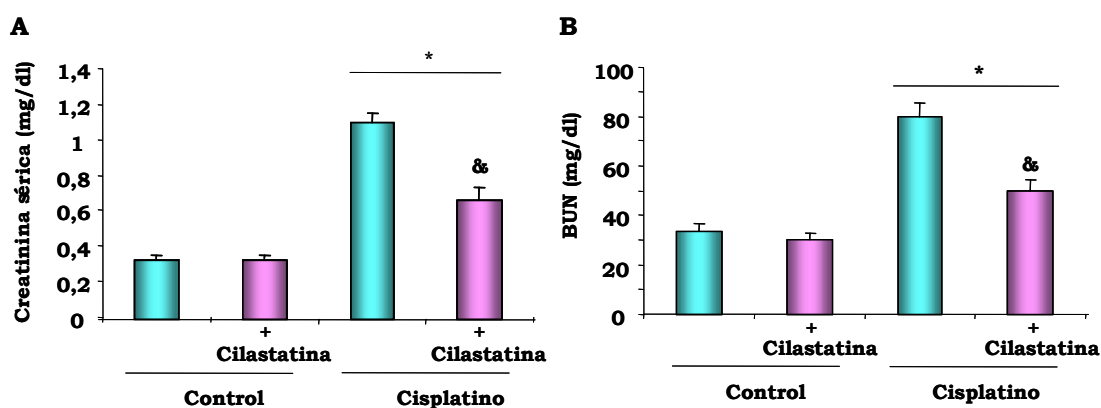
## 1.2.- CILASTATINA REDUCE EL DETERIORO DE LA FUNCIÓN RENAL PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO

La función renal se estudió mediante la determinación de diferentes parámetros hemodinámicos indicadores de daño en suero y orina, y por cortes histológicos donde comprobamos el estado de la morfología renal.

### 1.2.1.- Determinación de parámetros en suero

La creatinina es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (que es un nutriente útil para los músculos). Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que usualmente es producida por el cuerpo en una tasa muy constante, y normalmente filtrada por los riñones y excretada en la orina. La medición de la creatinina plasmática es la manera más simple de obtener una información rápida sobre la función de los riñones. Cuando la función renal es anormal, los niveles de creatinina se incrementan en la sangre, debido a la disminución en la excreción de ésta en la orina. Otra forma de cuantificar el daño renal es determinando el nitrógeno ureico (BUN) en sangre procedente de la urea. Los riñones filtran la urea de la sangre y ésta pasa a la orina, luego una concentración alta de BUN en sangre puede indicar una mala función renal.

En la figura 43 se muestran los valores de creatinina sérica (Fig. 43A) y BUN (Fig. 43B) ambas en mg/dl. Puede observarse que los animales control y control con cilastatina presentan valores inferiores de creatinina y BUN con respecto a los animales tratados con cisplatino. El grupo tratado con cisplatino más cilastatina muestra una reducción parcial significativa en ambos parámetros con respecto a los animales tratados únicamente con el quimioterápico, asemejándose a los valores control. Esto indica que los animales tratados con cisplatino y cilastatina presentan un daño renal menor que los animales que han sido tratados sólo con cisplatino.



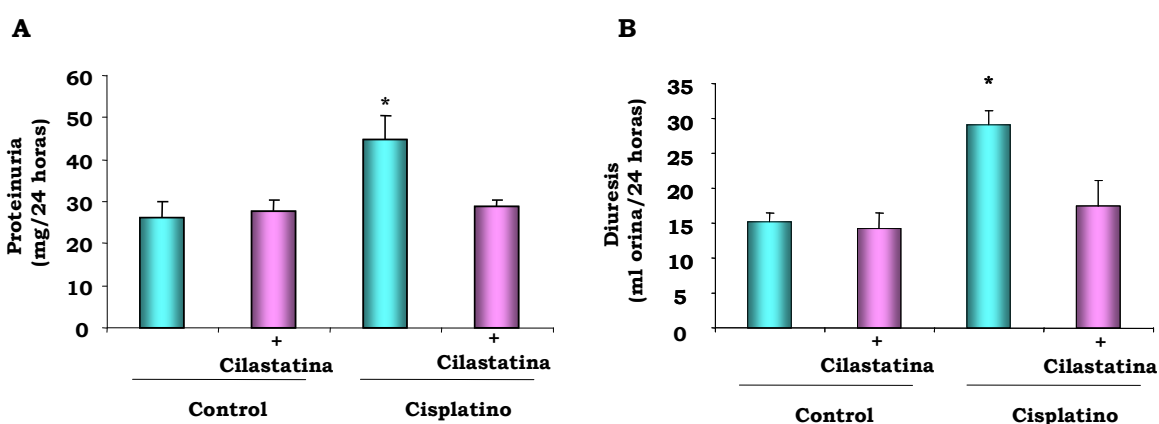
**FIGURA 43. Representación de los valores determinados de creatinina sérica, y BUN.** Puede observarse como los animales tratados con cisplatino presentan valores superiores de creatinina sérica y de BUN al compararlos con los animales tratados con cisplatino y cilastatina. Es decir, los animales tratados con cisplatino tienen peor función renal. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de  $n = 6-8$  animales por grupo, \*  $p \leq 0.005$  vs. control  $\pm$  cilastatina y &  $p \leq 0.0001$  vs. cisplatino.

### 1.2.2.- Determinación de parámetros en orina

Otros parámetros útiles para valorar el daño renal son la proteinuria y la capacidad de concentración urinaria.

El término médico proteinuria significa presencia de proteínas en la orina. La proteinuria es la primera manifestación de las enfermedades de los riñones y se produce por daño glomerular. La capacidad de concentración urinaria determina el volumen y la osmolaridad de la diuresis emitida.

En la figura 44 puede observarse como los animales tratados con cisplatino presentan niveles superiores de proteinuria en orina (Fig. 44A) y de diuresis (Fig. 44B) que los animales tratados con cisplatino y cilastatina. El cotratamiento de quimioterápico y nefroprotector produce niveles en ambos parámetros más cercanos a los encontrados en la situación control.

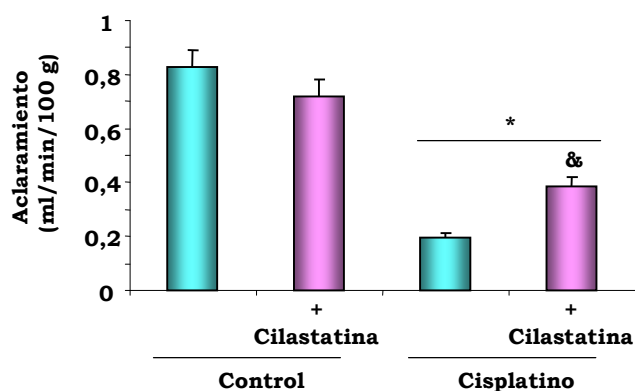


**FIGURA 44. Representación de los valores de excreción urinaria de proteínas y diuresis.** Puede observarse como los animales tratados con cisplatino presentan niveles más altos de proteinuria y de diuresis con respecto a los animales tratados con cisplatino y cilastatina. Por lo tanto los animales tratados sólo con el quimioterápico tienen mayor daño renal que aquellos animales tratados con éste y el nefroprotector. Este último grupo presenta valores de ambos parámetros semejantes a los encontrados en la situación control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de  $n = 6-8$  animales por grupo, \*  $p \leq 0.005$  vs. resto de grupos.

### 1.2.3.- Determinación del aclaramiento de creatinina

La creatinina sérica es un parámetro que no refleja el mismo grado de función renal en todos los individuos, al estar influenciada por una serie de factores como la edad, sexo, raza, superficie corporal, tipo de dieta, el uso de ciertas drogas, etc. Para evitar estas limitaciones, es necesario recurrir al aclaramiento de creatinina que refleja con mayor exactitud el FG y puede detectar precozmente el deterioro de la función renal, antes de la elevación de las cifras de creatinina.

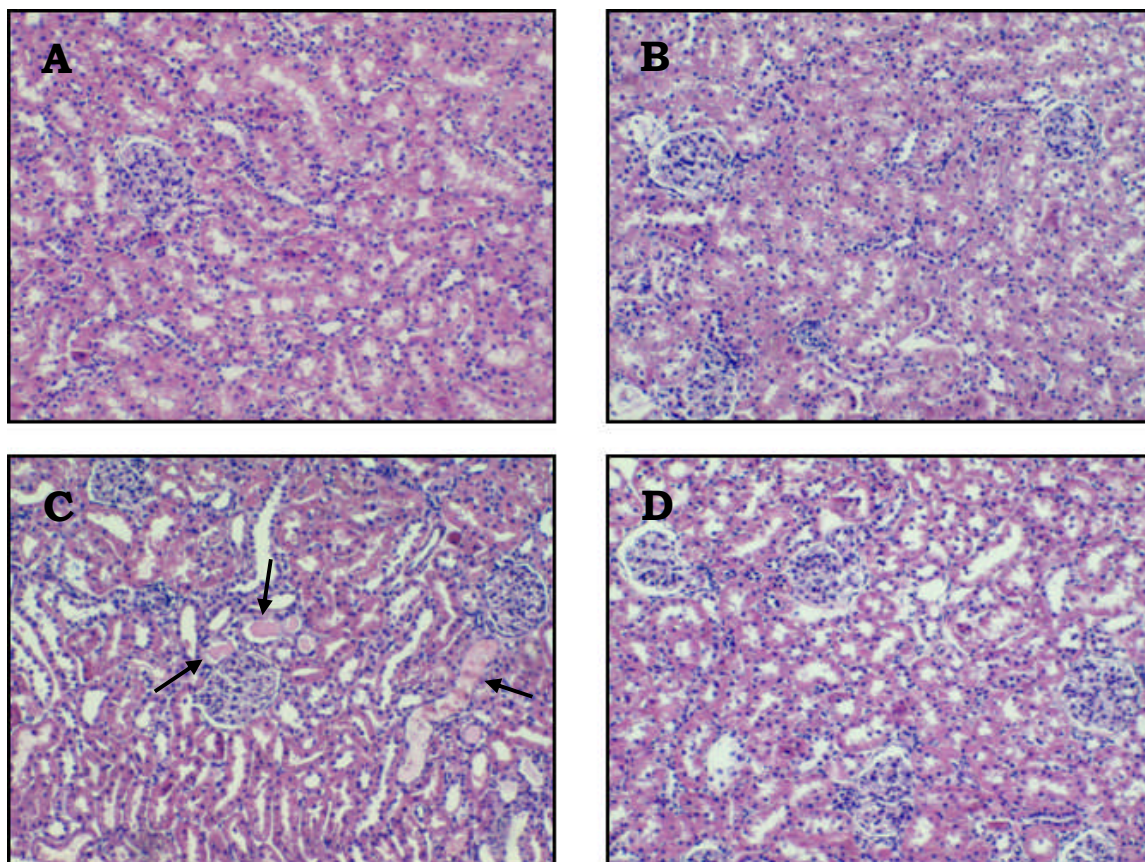
Al calcular el aclaramiento de creatinina se comprobó que los animales tratados con cisplatino presentaban una disminución significativa de este parámetro con respecto a los animales tratados a la vez con cisplatino y cilastatina (Fig. 45).



**FIGURA 45. Determinación del aclaramiento de creatinina.** Los animales tratados con cisplatino presentan una reducción en el aclaramiento de creatinina al compararlos con los animales tratados con cisplatino y cilastatina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de  $n=6-8$  animales por grupo, \*  $p \leq 0.0001$  vs. control  $\pm$  cilastatina; &  $p \leq 0.005$  vs. cisplatino.

#### 1.2.4.- Morfología renal

Una vez finalizado el modelo animal, las lesiones morfológicas fueron analizadas por microscopía óptica en secciones renales incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina. En la figura 46 se muestra una visión general de la histología renal de los cuatro grupos estudiados. Puede observarse como los animales control (Fig. 46A) y control con cilastatina (Fig. 46B) no presentan daño histológico. El grupo tratado con cisplatino mostró un daño renal importante a nivel túbular caracterizado por la aparición de depósitos de proteínas en la luz de algunos túbulos (Fig. 46C), lesión no observada en los animales tratados con cisplatino y cilastatina (Fig. 46D).



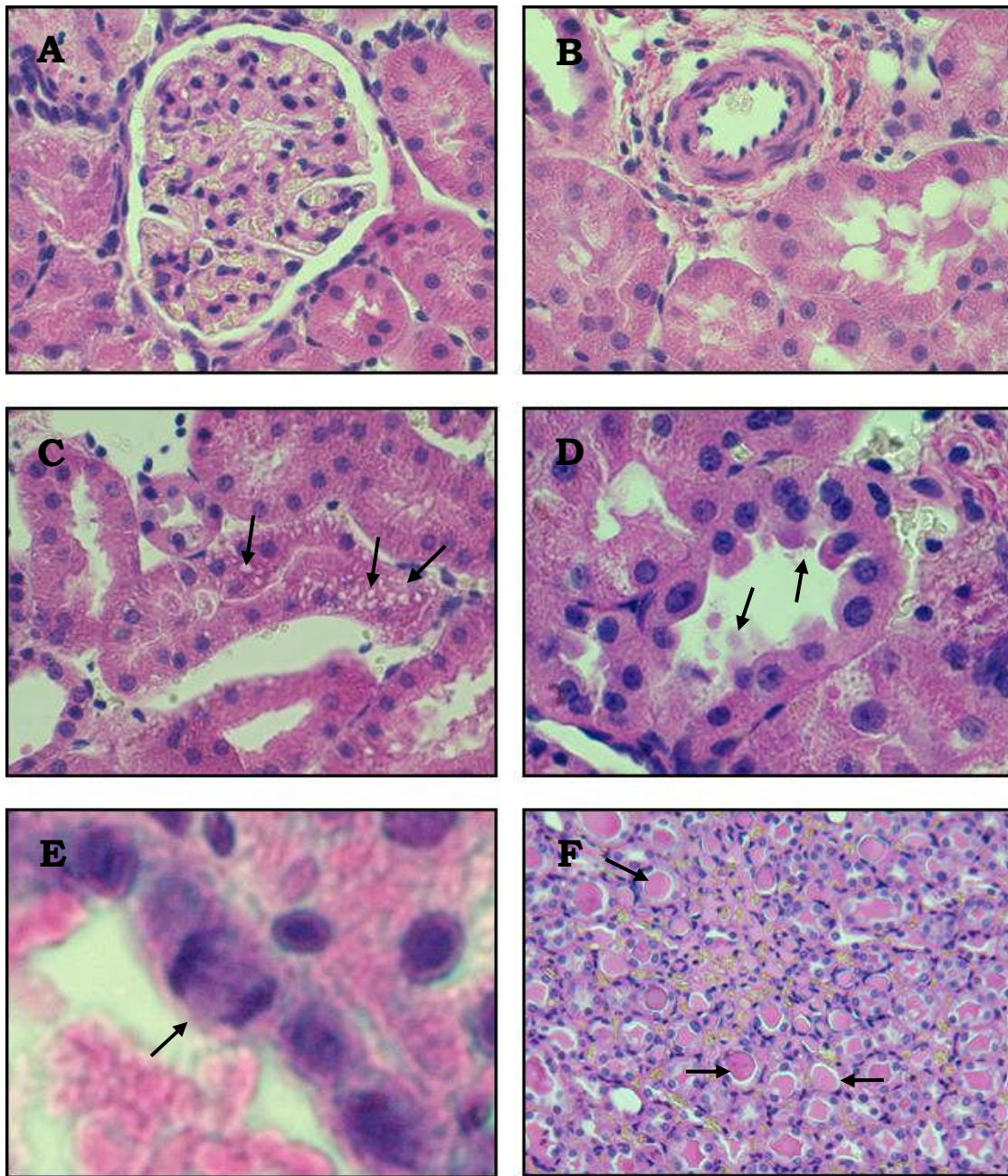
**FIGURA 46. Histología renal.** Imágenes representativas de **A.** grupo control, **B.** grupo control más cilastatina, **C.** grupo tratado con cisplatino y **D.** grupo tratado con cisplatino más cilastatina. (tinciones de hematoxilina-eosina, magnificación 10X). Las flechas señalan la presencia de depósitos proteicos en la luz de algunos túbulos proximales en los animales tratados con cisplatino.

Al estudiar en mayor profundidad y detalle las histologías del grupo tratado con cisplatino y el grupo tratado con cisplatino más cilastatina a nivel glomerular, vascular y tubular a nivel cortical y medular, se encontraron muchas diferencias entre ellos.

En la figura 47 se presenta la histología renal detallada correspondiente a animales tratados con cisplatino. En primer lugar puede observarse como el tratamiento con cisplatino no produce lesiones a nivel glomerular ni vascular, ya que ambas estructuras se mantienen inalteradas (Fig. 47A y 47B). A nivel del túbulo proximal el tratamiento con el quimioterápico produce una elevada vacuolización citoplasmática (Fig. 47C), descamación del epitelio tubular al liberarse cuerpos apoptóticos (Fig. 47D), regeneración celular en respuesta al daño y pérdida celular y del borde en cepillo (Fig. 47E). Por otro lado, puede comprobarse como el tratamiento con cisplatino también lesiona la zona medular, debido a que en la papila se observa como la luz de la mayoría de los túbulos se encuentra obstruida por material proteico (Fig. 47F).

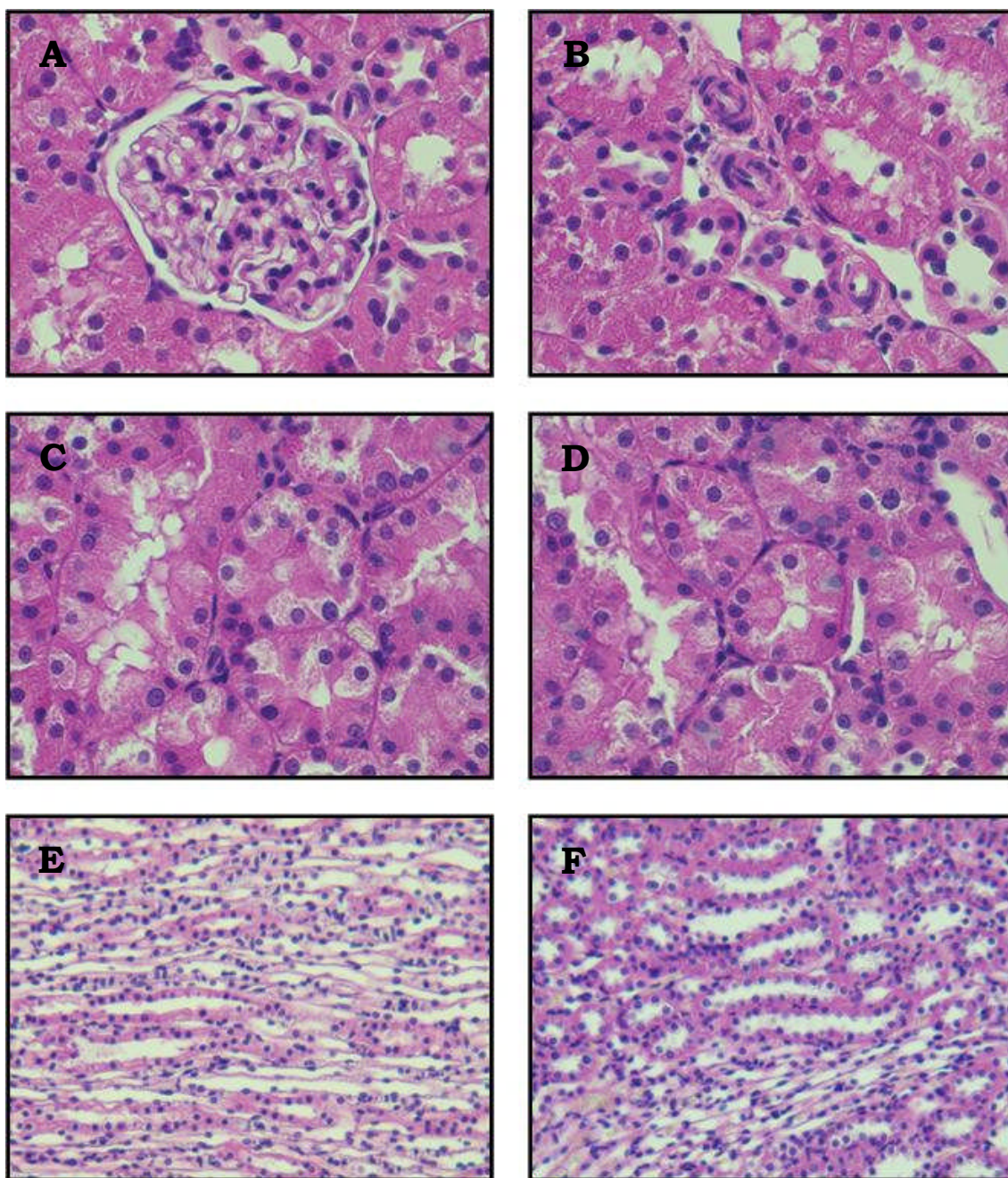
En el grupo de animales tratados con cisplatino y cilastatina tampoco se han encontrado alteraciones a nivel glomerular y vascular (Fig. 48A y 48B). A nivel tubular no se han observado procesos de vacuolización, descamación epitelial o regeneración celular, sin embargo, se ha podido apreciar cierto edema en los túbulos proximales (Fig. 48C y 48D). En la región medular se observa la ausencia de cilindros proteicos, ya que la luz de los túbulos de la papila no se encuentra obstruida (Fig. 48E y 48F). Todo esto demuestra que el daño renal producido por cisplatino en presencia de cilastatina es inferior al generado por el tratamiento con cisplatino sólo.





**FIGURA 47. Histología renal de animales tratados con cisplatino.** Imágenes representativas de la morfología glomerular y vascular (**A** y **B** respectivamente), (tinciones de hematoxilina-eosina, magnificación 40X). Imágenes representativas de las lesiones generadas por el tratamiento de cisplatino a nivel tubular y medular. **C.** vacuolización citoplasmática, **D.** descamación del epitelio tubular (generación de cuerpos apoptóticos), **E.** célula tubular en proceso de división (metafase) lo que indica regeneración celular en respuesta al daño y **F.** túbulos de la papila obstruidos por material proteico (tinciones de hematoxilina-eosina, magnificación 40X, 60X, 90X y 20X respectivamente).





**FIGURA 48. Histología renal de animales tratados con cisplatino y cilastatina.** Imágenes representativas de la morfología glomerular y vascular (**A** y **B** respectivamente), (tinciones de hematoxilina-eosina, magnificación 40X). Imágenes representativas de la morfología tubular y medular de animales tratados con cisplatino y cilastatina. **C** y **D**. edema en la región tubular proximal (tinciones de hematoxilina-eosina, magnificación 40X), **E** y **F**. túbulos de la papila sin obstrucción por material proteico (tinciones de hematoxilina-eosina, magnificación 20X).

## **VII.- *DISCUSIÓN***

---

## **1.- NEFROTOXICIDAD**

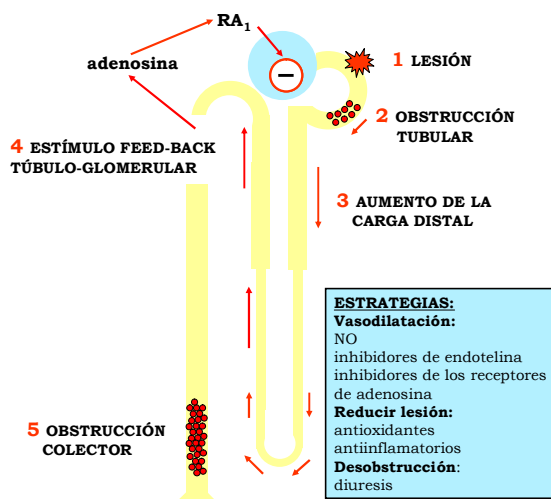
La incidencia de las nefropatías causadas por sustancias tóxicas ronda el 10% de los fracasos renales crónicos, y el 20% de los fracasos renales agudos. Puede definirse la nefropatía tóxica como una alteración de la estructura y/o función renal causada por sustancias exógenas o endógenas. La nefrotoxicidad es un problema que afecta a muchos fármacos y que limita su administración. Por este motivo, los efectos nefrotóxicos en algunos casos obligan a reducir las dosis o suspender la administración del fármaco antes de finalizar el tratamiento.

Existen diferentes mecanismos por los que las sustancias tóxicas pueden causar lesiones en la función renal. Hay sustancias que afectan directamente a la célula (citotoxicidad), que alteran su permeabilidad, que inhiben procesos enzimáticos, o interfieren en la síntesis proteica. También puede verse alterada la actividad de las bombas de transporte. Otras sustancias tributarias de nefrotoxicidad interfieren en la perfusión renal disminuyendo el flujo plasmático renal (FPR), añadiendo un componente de isquemia a la lesión. Existen asimismo lesiones renales obstructivas que aumentan la presión intratubular y disminuyen el FG.

El riñón es un órgano muy sensible a las sustancias tóxicas dada su gran vascularización y su función como depurador de sustancias. Ambos riñones reciben aproximadamente del 20% al 25% del gasto cardíaco, lo que representa un importante volumen de FPR. A su vez, el 20% del flujo recibido atraviesa el filtro glomerular y pasa a formar el fluido túbulo-proximal. Cada día se forman 180 litros de dicho fluido. A su paso por el túbulo proximal, se reabsorbe el 80% del volumen filtrado debido a que en este segmento tiene lugar un enorme transporte vectorial. Por este motivo, la mayoría de los tóxicos al reabsorberse de forma masiva y alcanzar la luz tubular pueden lesionar este segmento y aunque tienen lugar lesiones específicas sobre otros segmentos de la nefrona, la mayor parte de los efectos tóxicos producidos lesionan el túbulo proximal.

La agresión sobre el túbulo proximal se acompaña de la internalización de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, reduciendo el transporte vectorial a este nivel y desplazándolo hacia regiones más distales de la nefrona. Esto desencadena la activación del feed-back túbulo-glomerular y por lo tanto un aumento en la vasoconstricción renal que con frecuencia se interpreta como isquemia renal (Fig. 49). Recientemente nuestro laboratorio ha demostrado que el efecto vasoconstrictor de CsA a nivel renal es de hecho, secundario a su lesión sobre el túbulo proximal, que inhibe la producción tubular de  $\text{NO}$  <sup>73</sup> y activa el “feed-back” túbulo-glomerular <sup>24</sup>.

**FIGURA 49. Esquema de activación del “feed-back” túbulo-glomerular en respuesta al daño tubular.** Cuando la lesión de la nefrona aumenta la oferta de solutos a la mácula densa, ésta aumenta la concentración de adenosina local, reduciendo el FG a través de una vasoconstricción preglomerular dependiente de receptores A-1 (receptores de adenosina) localizados en la misma. Este mecanismo conocido como “feed-back” túbulo-glomerular contribuye a la reducción del FG.



Dado que el riñón es el órgano diana de numerosas sustancias tóxicas, ha desarrollado una serie de mecanismos de protección ante dichas toxinas, como por ejemplo la PgP, transportador empleado fisiológicamente para impedir la acumulación intracelular de moléculas ajenas a la célula, e implicado en la denominada resistencia farmacológica múltiple a los citostáticos. Presenta características topológicas que le permiten llevar a cabo la función de bomba expulsora de fármacos al exterior celular. Puede actuar impidiendo la entrada de fármacos o facilitando su salida de la célula. Hay fármacos que actúan como inhibidores de la PgP, bloqueando la expulsión de los tóxicos del interior al exterior celular aumentando la concentración intracelular <sup>6</sup>. Sin embargo, cuando la concentración de los tóxicos es muy elevada en el interior celular, la acción de la PgP no es suficiente para combatir el daño renal.

## 2.- NEFROPROTECCIÓN

El término “nefroprotección” ha sido utilizado en los últimos años para definir medidas preventivas y terapéuticas que tienen como objetivo evitar el deterioro tóxico de la función renal, mejorar su pronóstico, disminuir o retrasar la necesidad de diálisis, mejorar y optimizar el manejo de pacientes con riesgo de lesión renal.

La búsqueda de sistemas de nefroprotección frente a la toxicidad producida por distintos tóxicos es de gran interés para la práctica clínica. El inconveniente que presenta es que encontrar compuestos que puedan tener efecto sobre la nefrotoxicidad de múltiples fármacos sin modificar su actividad farmacológica, no siempre es sencillo. Esta complicación se debe en primer lugar a la gran variedad de fármacos nefrotóxicos utilizados en clínica que presentan características muy distintas en cuanto a formulación y propiedades químicas, diana de acción farmacológica y mecanismos de transporte. Por otro lado, la búsqueda de nefroprotectores se encuentra limitada porque es difícil hallar un compuesto que reduzca la toxicidad sin restringir la acción terapéutica del fármaco tóxico, ya que en la mayoría de los casos al bloquear la toxicidad del fármaco se bloquea también su efectividad terapéutica <sup>111</sup>.

Actualmente, la búsqueda de nefroprotectores que sean efectivos frente a varios nefrotóxicos sin reducir su acción terapéutica se ha convertido en un problema

prioritario. Su hallazgo mejoraría el manejo clínico de fármacos con efectos secundarios nefrotóxicos, y proporcionaría mejor calidad de vida a los pacientes.

Hay varios trabajos que presentan la acción nefroprotectora de distintos compuestos sobre la toxicidad producida por nefrotóxicos. Por ejemplo, el daño renal producido por CsA en CTP inmortalizadas de ratón, se reduce con el tratamiento de antioxidantes naturales como son el resveratrol, la vitamina E y el hidroxitirosol <sup>59</sup>. Otro caso, es la nefroprotección por clasterina sobre la toxicidad renal producida por gentamicina en CTP, donde el tratamiento con ambas presenta menor citotoxicidad que el tratamiento sólo con gentamicina <sup>60</sup>. Por último, comentar la protección ofrecida por ciertos inhibidores del ciclo celular como p21 adenovirus y roscovitina frente a la nefrotoxicidad producida por cisplatino en cultivos de CTP de ratón <sup>131</sup>.

Así pues, la dificultad actual en nefroprotección no se debe a la necesidad de inhibir procesos específicos implicados en el daño celular sino hacerlo de modo selectivo en la célula diana de la toxicidad, la célula tubular proximal.

En esta tesis se ha trabajado precisamente en este hecho, en encontrar algún compuesto que cumpla con los requisitos para ejercer correctamente como nefroprotector. Los resultados obtenidos nos han llevado a pensar que cilastatina puede ser un fármaco ideal. En primer lugar presenta una especificidad órgano-tisular conferida por su direccionamiento hacia la DHP-I <sup>15,32</sup> del borde en cepillo del túbulo proximal, lo que permite suponer que no tendrá efecto sobre células desprovistas de DHP-I, siendo su efecto específico del túbulo proximal. En segundo lugar, nos hemos enfrentado a un hecho hasta ahora desconocido, pero que confiere especial relevancia al uso de cilastatina. La entrada de distintos nefrotóxicos, de estructuras químicas, polaridades y cargas distintas, parece utilizar una vía común. La mayoría de ellos, se asumía que entraban en la célula por vía apical de modo no regulado, por difusión o pinocitosis. La entrada de todos ellos puede ser interferida por cilastatina, lo que implica algún tipo de relación entre la diana de cilastatina, DHP-I, y una vía común de transporte, probablemente las BDC del borde en cepillo.

Cilastatina sería apropiada para ser utilizada en condiciones clínicas diversas en combinación con fármacos dirigidos a distintos tejidos, ya que no reduciría la actividad farmacológica de los mismos en sus órganos-diana al ejerce su acción específicamente sobre la célula proximal del riñón.

### **3.- EVIDENCIAS PREVIAS DEL EFECTO NEFROPROTECTOR DE CILASTATINA**

Cilastatina fue diseñada para inhibir de manera competitiva la DHP-I del borde en cepillo del túbulo proximal renal <sup>15</sup>. El objetivo de esta inhibición era impedir la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem y así conseguir que los niveles de imipenem intacto en el tracto urinario fueran mayores. De forma paralela y

desintencionadamente se logró disminuir la entrada de imipenem en la célula epitelial renal, reduciendo así su toxicidad <sup>15,32,79</sup>.

En los años 80, la investigación farmacológica sobre CsA y sus posibles interacciones con otros fármacos de uso común permitió obtener evidencias de que la asociación de I/C podía ser útil para disminuir la nefrotoxicidad del inmunosupresor, principal efecto secundario de éste, que afecta tanto al riñón nativo (en trasplantes hepáticos, cardíacos o de médula ósea) como al trasplantado (trasplante renal) <sup>23</sup>, siendo en ambos casos el efecto dependiente de la dosis. Sin embargo, se observó que la coadministración de I/C en el tratamiento con CsA producía una disminución de la alteración de la función renal en ratas <sup>151</sup>. Esto se confirmó en ratas nefrectomizadas sometidas a un trasplante renal <sup>69</sup> y posteriormente en seres humanos, demostrándose que la administración de cilastatina puede contrarrestar la nefrotoxicidad inducida por CsA en el periodo inmediato posterior a un trasplante cardíaco <sup>105</sup>, de médula ósea <sup>66</sup> y renal <sup>27,159</sup>. Estudios posteriores demostraron que cilastatina reducía la nefrotoxicidad de compuestos estructuralmente diferentes como el tacrolimus <sup>129</sup> y la vancomicina <sup>117,162</sup> que tampoco eran sustrato de la DHP-I.

Los estudios de nefroprotección por I/C sobre CsA cayeron en el olvido, porque en los años 90 se pensaba que CsA inducía vasoconstricción renal, y su toxicidad era debida a isquemia, por la que no existía una explicación para el efecto observado.

Sin embargo, en nuestro laboratorio estudiábamos el efecto tóxico directo de CsA sobre las CTP, en lo que induce muerte por apoptosis tras una entrada en la misma aparentemente difusiva. En el contexto de nuestra investigación, la posibilidad de que un ligando del borde en cepillo redujese la toxicidad renal era totalmente factible, por lo que obtuvimos cilastatina pura (MSD) para iniciar nuestros estudios *in vitro*.

Estudios posteriores de nuestro grupo demostraron mediante un metaanálisis <sup>159</sup> que el efecto observado por Sido <sup>151</sup>, Hammer <sup>69</sup>, Markewitz <sup>105</sup>, Gruss <sup>66</sup>, Baghaie <sup>9</sup> y Carmellini <sup>27</sup> sobre la reducción de la toxicidad de CsA por cilastatina era absolutamente cierto, y cuantificamos en un 44 % la reducción de la nefrotoxicidad, y en un 76 % la reducción del riesgo de FRA.

Dado que CsA, tacrolimus y vancomicina no son sustrato de la DHP-I, no se conocían las razones del efecto nefroprotector de cilastatina frente a la nefrotoxicidad producida por estos tóxicos cuando se administraban conjuntamente. En consecuencia, empezamos a pensar que tal vez la inhibición de la DHP-I no fuese necesaria para que tuviera lugar la acción nefroprotectora ejercida por cilastatina, sino el hecho de que DHP-I se encuentre localizada en la membrana y cilastatina se una a ella. La relación de cilastatina con una proteína anclada a la membrana del borde en cepillo nos hacía suponer que su acción nefroprotectora pudiera estar relacionada con el transporte de los tóxicos al interior celular del túbulo proximal.

## **4.- EFECTOS RENALES DE CILASTATINA**

Los estudios preclínicos sobre cilastatina previos a la comercialización de I/C no demostraron efectos lesivos renales para las concentraciones que se preveían usar en clínica, aunque no se realizaron estudios de toxicidad específica sobre CTP.

I/C se utiliza actualmente en clínica para tratar infecciones urinarias, respiratorias, abdominales y cutáneas, así como en infecciones ginecológicas, óseas y articulares. En general, infecciones bacterianas avanzadas en pacientes con graves enfermedades subyacentes. Su uso ha seguido vigente aunque en uno de los primeros trabajos publicados sobre cilastatina, previos a su comercialización, se afirmó que cilastatina a dosis de 1 g/kg/día podía producir descamación del endotelio tubular como manifestación de toxicidad renal <sup>138</sup>. Sin embargo, en nuestros estudios dosis-respuesta con cilastatina hemos comprobado que carece de efecto deletéreo sobre el túbulo proximal, incluso a concentraciones cinco veces superiores a las alcanzadas en clínica, no pudiendo constatar ningún efecto significativo sobre la dinámica de crecimiento, la confluencia celular, la morfología de la monocapa, la inducción de anoikis, la aparición de nucleosomas, o la función oxidativa mitocondrial. En el modelo animal realizado, tampoco se encontraron diferencias entre el grupo control y el grupo tratado con cilastatina, obteniendo siempre resultados semejantes en ambos.

## **5.- AMPLIANDO LA COBERTURA DE CILASTATINA: SELECCIÓN DE NEFROTÓXICOS**

Al conocer que la acción nefroprotectora de cilastatina también tiene lugar sobre tóxicos que no eran sustratos de la DHP-I, nos planteamos las siguientes preguntas:

✓ ¿Es posible que cilastatina interfiera con la toxicidad renal producida por distintos nefrotóxicos?

✓ ¿La acción nefroprotectora de cilastatina puede ser debida a una interacción de la misma con el transporte de los tóxicos al interior celular?

Para contestar a estas preguntas, decidimos usar diferentes fármacos de conocido efecto tóxico renal y ampliamente utilizados en la práctica clínica. Nuestra selección buscaba incluir fármacos con dianas de toxicidad diferentes, mecanismos de acción variables y características fisico-químicas distintas:

Se han seleccionado tóxicos que ejercen su acción sobre la mitocondria como CsA, sobre el RE como el paracetamol, sobre el ADN nuclear como el cisplatino, etc. En segundo lugar, se ha considerado el mecanismo que utiliza cada uno de los fármacos para alcanzar el interior celular y la fórmula química del compuesto, considerando su acidez/basicidad, su solubilidad en agua y medios orgánicos y su polaridad. De esta forma nos aseguramos cubrir todas las posibles condiciones facilitadas o restrictivas del transporte al interior celular y observar si cilastatina interfiere en todas por igual o puede existir una distinción en función de la protección



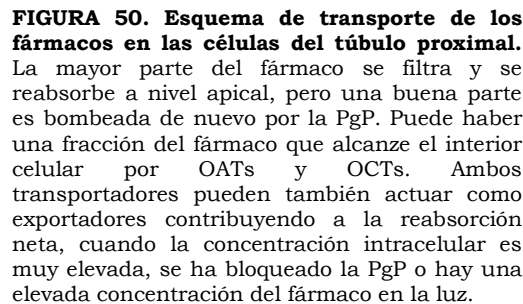
ejercida. Por este motivo, dentro del grupo de tóxicos estudiados, se encuentran tanto compuestos polares como apolares, catiónicos o neutros, liposolubles o hidrosolubles, para la mayoría de los cuales no hay descrita una vía preferencial de entrada celular. Asimismo, los fármacos seleccionados fueron, CsA y tacrolimus (inmunosupresores), vancomicina y gentamicina (antibióticos), cisplatino (quimioterápico), paracetamol (analgésico), foscarnet (antiviral), anfotericina B (antifúngico), iopamiro (contrastes iodado), manitol (diurético) y cloroformo (anestésico).

Una vez seleccionados, se llevó a cabo un rastreo del comportamiento de los mismos en cuanto a producción de muerte celular por apoptosis y su relación con el efecto protector de cilastatina. A la vista de los resultados pudimos observar que el efecto lesivo de todas las sustancias tóxicas para el túbulo proximal probadas era reducido por cilastatina (Fig. 14). Sin embargo, el efecto protector de cilastatina presentó dos comportamientos diferentes, permitiendo agrupar a los fármacos en dos bloques (Fig. 15). Un grupo de fármacos mostraba una protección completa por cilastatina, reduciéndose los niveles de muerte celular hasta alcanzar valores similares a los encontrados en la situación control, y un segundo grupo presentaba una protección parcial, cilastatina reducía la aparición de muerte celular sin llegar a alcanzar los niveles control. Al estudiar la muerte celular por apoptosis producida por los tóxicos en presencia y ausencia de cilastatina mediante la cuantificación del enriquecimiento nucleosomal, encontramos una protección completa en los cotratamientos de CsA, gentamicina, tacrolimus, vancomicina, cisplatino, contrastes iodados y foscarnet, y una protección parcial con manitol, anfotericina B, cloroformo y paracetamol (Figs. 14 y 15). Si cilastatina estuviese interfiriendo con el transporte de los tóxicos al interior celular, esta diferencia en cuanto a la acción protectora de la misma podría ser debida a que la vía de transporte al interior celular utilizada por los fármacos del primer grupo sea inhibida por la acción de cilastatina, y por este motivo encontraríamos una protección total. Sin embargo, en el segundo grupo el transporte tendría lugar tanto a través de una vía inhibida por cilastatina como por otras vías.

Se seleccionaron cinco fármacos del grupo de protección completa (CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina y cisplatino) y un fármaco del grupo de protección parcial (paracetamol) en los que se caracterizó el daño renal que producen y la protección ejercida por cilastatina.

Se ha descrito que cilastatina puede inhibir algunos OATs a nivel basolateral<sup>47</sup>. Las hipótesis sobre su implicación en el metabolismo de otros fármacos han tenido poco éxito, ya que el efecto esperado de su acción sobre los OATs sería la de aumentar los niveles circulantes de los fármacos implicados y reducir su aclaramiento renal. Sin embargo, el efecto observado es exactamente el opuesto. Por tanto, sería posible que el menor efecto nefroprotector de cilastatina sobre los fármacos de carácter aniónico a pH fisiológico se deba al bloqueo de un sistema alternativo de extrusión a través de los OATs (Fig. 50).





En nuestros resultados hemos observado que todos los fármacos estudiados producen muerte celular al actuar sobre la función o actividad de diversas estructuras celulares, y que la presencia de cilastatina reduce la aparición de la misma.

A continuación estudiamos los cambios funcionales producidos por los tóxicos en los cultivos de CTP. En primer lugar, observamos una alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, ya que la transferencia electrónica aparecía disminuida tras el tratamiento con los diferentes tóxicos. La coadministración con cilastatina impidió la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial de manera parcial en el tratamiento con CsA, tacrolimus, vancomicina y cisplatino. En el caso del paracetamol el efecto de cilastatina fue menos marcado. Al encontrar un efecto menor de protección para paracetamol, comprobamos que cilastatina no está interaccionando directamente con la mitocondria, ya que el efecto protector encontrado tendría que ser igual para todos los fármacos estudiados. Esto confirma la posibilidad de que cilastatina esté interfiriendo con un sistema de transporte común de los fármacos al interior celular. El paracetamol no usaría esta vía de entrada o al menos no la usaría en exclusividad, por lo que presenta una menor protección.

- 109 -

que cisplatino altera la función de la cadena respiratoria al estudiarla en tiempo real. Lorz, en 2004, demostró que el paracetamol a una concentración de 300 µg/ml no inducía daño mitocondrial, no producía alteraciones en el potencial de membrana, ni liberación de factores proapoptóticos como citocromo C y Smac/DIABLO <sup>101</sup>. Sin embargo, en nuestros estudios hemos comprobado que una dosis de 600 µg/ml produce cambios en la función oxidativa mitocondrial en tiempo real.

Estos estudios de determinación de la actividad mitocondrial en tiempo real nos permitieron demostrar de nuevo que el efecto protector de cilastatina podría ser debido a una interacción con el transporte, ya que, pudimos comprobar que la protección era instantánea, lo que sugirió que no tenía lugar la modificación o la activación de mecanismos de transcripción y traducción.

A consecuencia de la variación en la cadena respiratoria mitocondrial, se reduce el bombeo de protones y se altera el potencial de membrana mitocondrial produciéndose la liberación del citocromo C, que desencadenará la apoptosis tras la formación del apoptosoma y la activación de caspasa-3. Tanto la pérdida de potencial mitocondrial como la liberación de citocromo C, fueron observadas en nuestros cultivos de CTP tratados con cisplatino. Al estudiar el efecto de cilastatina sobre la alteración producida por cisplatino en el potencial de membrana mitocondrial pudimos comprobar que la coadministración de cilastatina mantuvo el potencial de membrana y como consecuencia, impidió la liberación del citocromo C.

Varios estudios publicados anteriormente muestran que el tratamiento con cisplatino y CsA produce alteraciones en el potencial de membrana <sup>90,91,124,128</sup> y promueven la liberación de citocromo C <sup>124,168</sup>. Wang estudió el efecto de la hipoxia como protector del daño renal causado por cisplatino en CTP de ratón inmortalizadas. Pudo observar como el hecho de someter a estas células a un 2% de oxígeno para inducir hipoxia producía una protección frente al daño causado por cisplatino. Uno de los eventos que encontró disminuido tras la generación de la hipoxia fue la liberación de citocromo C desde la mitocondria al citosol <sup>168</sup>.

Al comprobar que cilastatina limita la liberación de citocromo C, necesario para la activación de la apoptosis, y observar en presencia de cilastatina una disminución de la misma en el estudio de rastreo de fármacos, nos planteamos estudiar los mecanismos que tienen lugar durante este proceso y la viabilidad celular.

Una vez activada la caspasa-3 se producen una serie de acontecimientos que conducen a la célula a morir por apoptosis. Por ejemplo, se activan endonucleasas encargadas de fragmentar el ADN. En los resultados obtenidos comprobamos que todos los tóxicos ensayados producían fragmentación nucleosomal y que la presencia de cilastatina reducía dicha fragmentación. Varios estudios *in vitro* con cisplatino y paracetamol confirman nuestros resultados sobre fragmentación nucleosomal generada por ambos tóxicos <sup>60,101,124</sup>.

Como se ha comentado anteriormente, la agresión tóxica o isquémica sobre el túbulo se traduce en un tipo de muerte celular asociada al desprendimiento de las células dañadas, proceso conocido como anoikis. La inducción de anoikis por los nefrotóxicos en estudio, puede medirse cuantificando el número de células que pasan de la monocapa al sobrenadante del cultivo mediante citometría de flujo. La adición de cilastatina a los cultivos redujo en el caso de vancomicina, gentamicina y cisplatino el número de células desprendidas al medio de cultivo sobrenadante. En el caso del paracetamol no encontramos diferencias entre la situación control y los cultivos tratados con distintas dosis del fármaco.

Para estudiar el efecto de los tóxicos y de la coadministración de cilastatina con la regeneración y la viabilidad celular determinamos varios parámetros, dinámica de crecimiento, el número de unidades formadoras de colonias tras la agresión con los distintos nefrotóxicos y la capacidad oxidativa mitocondrial del túbulo proximal. En los resultados obtenidos comprobamos que cilastatina previene de forma parcial el efecto de los nefrotóxicos (CsA y tacrolimus) sobre el crecimiento celular, protegiendo de su nefrotoxicidad. Observamos que en presencia de cilastatina el número de unidades formadoras de colonias proximales aumenta de modo significativo tras la agresión de los nefrotóxicos. Por último comprobamos como el tratamiento con cilastatina restaura la capacidad oxidativa mitocondrial del túbulo proximal. Algunos autores han demostrado que tóxicos como gentamicina, CsA, paracetamol o cisplatino producen una disminución de la viabilidad celular <sup>59,60,101,131</sup>. El tratamiento con antioxidantes naturales como el resveratrol, hidroxitirosol y la vitamina E junto a CsA mejora la viabilidad celular de los cultivos cuando los comparamos con aquellos sometidos sólo al tratamiento con CsA <sup>59</sup>.

Por último, uno de los datos más significativos fue la cuantificación de la concentración intracelular de los tóxicos en presencia y ausencia de cilastatina. Los resultados mostraron que el tratamiento con cilastatina se correspondía con una disminución de la acumulación de todos los fármacos en las CTP. Esto apoya nuevamente la posibilidad de que cilastatina esté interfiriendo a nivel del transporte de los tóxicos del medio externo al interior celular.

Un estudio de los posibles cambios en el comportamiento y distribución intracelular de cada uno de los nefrotóxicos seleccionados, ayudaría a confirmar indirectamente que la protección por cilastatina se produce por interferencia en el transporte, ya que en los organismos vivos la entrada, acumulación y actividad de un elemento o metal dado puede estar influenciado por su forma química específica en la muestra biológica, que puede dictar su toxicidad, o impacto medioambiental.

Aunque el estudio para todos los fármacos estaba más allá de los objetivos de esta tesis, tuvimos acceso de esta información en el caso del cisplatino. Como ya se comentó en los resultados (figura 39), se obtuvo una especiación determinada en las CTP tratadas únicamente con cisplatino, que fue idéntica a la encontrada en presencia

de cilastatina. Cuando se aplica cisplatino en un tratamiento, su comportamiento, su capacidad de unión a biomoléculas y su actividad intracelular (especiación), es lo que determina e influye en la capacidad antitumoral del fármaco en una célula o tejido determinado. Una de las principales características que debe tener un nefroprotector es que no impida de antemano su capacidad como quimioterápico, manteniéndose de hecho constante la proporción entre las especies metálicas que aparecen. Con cilastatina, el cromatograma de especiación es el mismo, es decir la proporción se mantiene inalterada, sugiriendo que cilastatina no modifica el destino intracelular del cisplatino. Relacionando este resultado con la evidencia de que en presencia de cilastatina había una menor acumulación intracelular de los fármacos en general y cisplatino en particular, parece claro que el efecto protector de la misma no es por ningún tipo de interferencia intracelular, sino que mas bien se relaciona con una reducción en la entrada del cisplatino en las CTP.

Al confirmar de nuevo con estos resultados que cilastatina posiblemente realiza su acción nefroprotectora al reducir el transporte de los tóxicos al interior celular, buscamos mecanismos por los que pudiera estar ejerciendo esta inhibición. Al conocer que DHP-I se ancla por un residuo GPI a la membrana del borde en cepillo y que los grupos GPI, de manera generalizada, se localizan en regiones de la membrana ricas en colesterol y esfingolípidos (BDC) <sup>125</sup>, estudiamos la posibilidad de que cilastatina interfiriera con estas estructuras. Los resultados mostraron que la presencia de cilastatina producía un bloqueo en la recircularización de las BDC.

## **7.- ESPECIFICIDAD DE LA PROTECCIÓN**

Uno de los requisitos principales que tiene que cumplir una sustancia para poder ejercer de forma correcta como nefroprotector, es que su acción sea órgano-específica y por lo tanto, no reduzca la acción terapéutica del fármaco tóxico, ya que en la mayoría de los casos al bloquear la toxicidad del fármaco se bloquea su actividad <sup>111</sup>. Este suele ser sin duda el principal problema de otras sustancias protectoras, por lo que su uso queda en muchos casos reducido en estudios preclínicos experimentales, sin llegar a tener aplicación clínica.

Como se ha comentado, cilastatina cumple dicha característica al unirse a la DHP-I del borde en cepillo de las CTP. Para demostrarlo se realizaron estudios de cuantificación de apoptosis y ensayos de viabilidad celular en linfocitos y células HeLa (respectivamente) para conocer si cilastatina limitaba específicamente la acción de CsA y cisplatino sobre sus células diana. Los resultados obtenidos han demostrado que la presencia de cilastatina en estos tipos celulares no limita ni reduce el efecto de ambos fármacos sobre sus células diana, confirmándose por tanto, la especificidad órgano-tisular de cilastatina.

## 8.- EVIDENCIAS PRECLÍNICAS: MODELOS ANIMALES

Existen varios modelos animales que demuestran el efecto protector de cilastatina frente a la toxicidad producida por CsA y vancomicina. En 1987 Sido observó que la inclusión de I/C en el tratamiento con CsA producía una disminución de la alteración de la función renal en ratas <sup>151</sup>. Estos experimentos se confirmaron en ratas nefrectomizadas sometidas a trasplante renal <sup>69</sup>. En 1996, Toyoguchi mostró que la asociación I/C podía reducir la nefrotoxicidad de vancomicina en conejos <sup>162</sup>. Un año después, realizando estudios sobre el FG del animal, mostró que cilastatina sola aceleraba la eliminación renal de vancomicina, reduciendo sus niveles en plasma y en tejido renal <sup>163</sup>. Kusama llevó a cabo un estudio fármaco-cinético de la presencia de cilastatina en animales a los que se les había suministrado vancomicina <sup>94</sup>, demostrando que el aumento de aclaramiento de vancomicina inducido por cilastatina se acompaña de reducción en su aclaramiento renal. No encontraron cambios en el FG con cilastatina, por lo que no pudieron demostrar ningún efecto de nefroprotección, aunque sugirieron la existencia de un posible efecto potencial, relacionándolo con la inhibición de la DHP-I por parte de la cilastatina. Nakamura realizó análisis la disminución de la excreción de vancomicina en presencia de I/C <sup>117</sup>.

Al conocer los resultados *in vitro* presentados en esta tesis, donde el cotratamiento con cilastatina reduce la entrada del fármaco al interior celular y el daño renal producido por éste, y plantear la idea de que la nefroprotección ejercida por cilastatina podría tener lugar por interferencia con el transporte de los tóxicos al interior celular, diseñamos un modelo animal para estudiar la posible nefroprotección por cilastatina frente a la toxicidad producida por cisplatino.

En el presente modelo animal, las ratas tratadas con cisplatino mostraron una disminución en el peso corporal. Esta pérdida de peso fue atenuada por el cotratamiento con cilastatina. Muchos autores han descrito la pérdida de peso en ratas tratadas con cisplatino <sup>4,8,51</sup>. Mora sugirió que la pérdida de peso inducida por el tratamiento con cisplatino era debida a la toxicidad gastrointestinal producida por el quimioterápico y por la reducción de la ingesta de comida que sufrían los animales a consecuencia del tratamiento con cisplatino <sup>112</sup>. La alteración de la función renal producida por cisplatino es reconocida como el principal efecto y el factor más importante en la limitación de la dosis asociada con el uso clínico. Varias investigaciones consideran que las alteraciones inducidas por cisplatino en la función renal son caracterizadas por niveles elevados de creatinina y urea en plasma <sup>65,118</sup>. Por lo tanto, la función renal fue evaluada por la determinación de ambos parámetros, y además por proteinuria, volumen de diuresis y aclaramiento de creatinina. En el presente estudio, hemos mostrado que la administración de cisplatino en ratas causa una reducción del FG, lo cual se corresponde con un incremento en la creatinina y BUN plasmáticos. De acuerdo con Kishore, el tratamiento de cisplatino induce

alteraciones en la regulación de la permeabilidad al agua ya que al provocar daño medular se produce una disminución de la expresión de aquoporinas renales <sup>85</sup>. Esto explica que los animales tratados con cisplatino presenten volúmenes de orina significativamente superiores a los encontrados en los animales control, resultados también observados por otros grupos <sup>4,56</sup>. La nefrotoxicidad producida por cisplatino se caracteriza también por una ligera pérdida de proteínas en la orina <sup>25</sup>. El cotratamiento con cilastatina fue capaz de restaurar parcialmente todos los parámetros anteriores, de mejorar el FG ya que se determinaron niveles de creatinina y BUN plasmático más cercanos a los encontrados en los animales control. El grupo tratado con cisplatino y cilastatina presentó niveles de proteinuria y de diuresis significativamente inferiores a los cuantificados en los animales tratados sólo con cisplatino. Este efecto protector de cilastatina fue confirmado en los estudios morfológicos e histoquímicos llevados a cabo. Estos fueron realizados en cortes de riñón de animales sometidos durante 5 días a una única dosis inicial de cisplatino (5 mg/kg/día), debido a que el pico máximo de necrosis inducida por el quimioterápico en el túbulo proximal y distal en ratas ocurre entre el día 5 y 7 después de dicha inyección <sup>40</sup>. En estos estudios histológicos pudimos observar como el tratamiento con cisplatino produce pérdida del borde en cepillo, necrosis, vacuolización celular, descamación del epitelio y presencia de cilindros proteicos, y como con la administración de cilastatina este daño renal se encuentra disminuido. En todos los parámetros estudiados pudimos comprobar que cilastatina no tiene ningún efecto persé en la función renal.

Estos resultados obtenidos coinciden con los presentados por varios autores, donde se aprecia que el tratamiento con cisplatino produce un aumento de los niveles de creatinina sérica, BUN, proteinuria y volumen de diuresis y a nivel histológico provoca necrosis tubular, una marcada vacuolización, formación de cilindros proteicos, etc <sup>30,56,99,111,154</sup>. Estos trabajos presentan en paralelo el efecto protector de varios compuestos con características antioxidantes y antiinflamatorios. Se han estudiado una amplia variedad de compuestos con características antioxidantes como vitamina C <sup>51</sup>, inhibidores de la iNOS <sup>30</sup>, licopeno <sup>8</sup>, resveratrol <sup>40</sup>, espirulina <sup>111</sup>, edaravone <sup>154</sup>, con actividad antiinflamatoria como por ejemplo genisteína <sup>155</sup> y partenolide <sup>56</sup>, y compuestos que reúnen ambos efectos como curcumina <sup>92</sup>, para disminuir la nefrotoxicidad provocada por el tratamiento de cisplatino en modelos animales. El cotratamiento de cisplatino con estas sustancias mejora la función renal al disminuir todos los parámetros anteriores y presentar una histología con menor daño. Pero la realidad es que algunos de estos compuestos presentan ciertos problemas a la hora de pensar en realizar el paso de modelo animal a ensayo clínico. Por ejemplo, el uso de partenolide como nefroprotector se encuentra limitado por la dosis, ya que dosis elevadas inducen un incremento del anión superóxido provocando estrés oxidativo y muerte celular <sup>56,99</sup>. Algo semejante ocurre en el caso de edaravone

<sup>154</sup>, ya que las dosis utilizadas en los estudios in vivo son dosis muy superiores a las toleradas en la práctica clínica. Otro ejemplo, es el caso de espirulina <sup>111</sup>, alga verde-azulada con propiedades antioxidantes que requeriría un exhaustivo examen previo a su posible aplicación en clínica. Y por último, para reducir la nefrotoxicidad producida por cisplatino, se han utilizado inhibidores de la iNOS como por ejemplo 1400W. Es conocido que este compuesto modifica la presión sanguínea, no conociéndose por tanto los posibles efectos secundarios tras su tratamiento <sup>30</sup>.

Todos los trabajos anteriores se centran en reducir la nefrotoxicidad del cisplatino de forma indirecta, es decir, bloqueando o disminuyendo mecanismos lesivos que produce el tratamiento con cisplatino sobre el túbulo renal. Sin embargo, ninguno de los compuestos presentados anteriormente y por lo tanto ninguna estrategia de nefroprotección, actúa de manera directa sobre la toxicidad tubular, limitando la entrada del fármaco al interior celular y consecuentemente, disminuyendo los mecanismos de daño que tienen lugar en el túbulo renal.

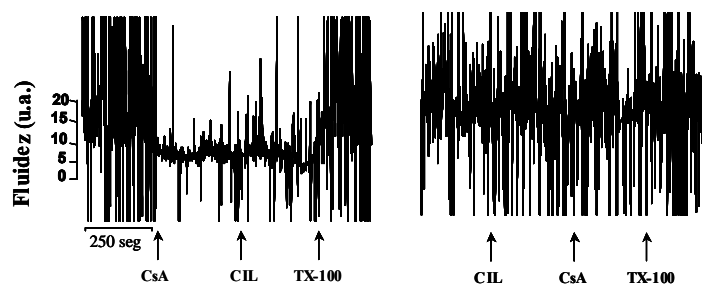
## **9.- MECANISMOS DE LA PROTECCIÓN RENAL POR CILASTATINA**

Mraz sugirió que el efecto nefroprotector de I/C sobre CsA, atribuido en su caso a la cilastatina, se debía a la reducción de las concentraciones plasmáticas de CsA <sup>114,115</sup>. Sin embargo, Markewitz no encontró diferencias significativas en las dosis de CsA ni en los niveles sanguíneos de CsA o sus metabolitos <sup>105</sup>, al igual que Sido <sup>151</sup> y Hammer <sup>69</sup>. Por su parte, Gruss observó que los pacientes tratados con I/C tenían niveles de CsA menores que los pacientes no tratados con I/C. Sin embargo, el efecto protector de cilastatina no se pudo atribuir a cambios en los niveles de CsA <sup>66</sup>.

Hay evidencias previas de que cilastatina protege frente a la toxicidad de CsA, tacrolimus y vancomicina que no son sustratos de la DHP-I <sup>129,163</sup>. Por lo tanto, como hemos comentado anteriormente, la acción nefroprotectora no se debe a la inhibición de la enzima, sino más al hecho de que cilastatina se une a la DHP-I que se encuentra anclada a la membrana celular mediante un enlace covalente a una estructura GPI <sup>1,121</sup>, residuo que se localiza típicamente en dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos o BDC <sup>113,125</sup>. Si tenemos en cuenta que las BDC son estructuras que pueden estar implicadas en procesos de transporte transmembrana, endocitosis, señalización en transducción de señales <sup>21,174</sup>, sería lógico plantear una posible relación entre el efecto protector de cilastatina al inhibir el transporte de los tóxicos al interior celular y las BDC implicadas en transporte celular.

Datos anteriores de nuestro laboratorio confirmaron esta posibilidad, al demostrar la relación entre cilastatina, CsA, membrana celular y BDC. Estos estudios mostraron que cilastatina impedía la acción de CsA sobre la fluidez de membrana y reducía su transporte al interior celular vía BDC <sup>129</sup> (Fig. 51 y 52).

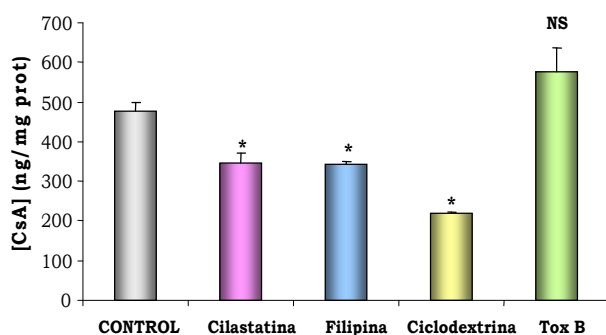
En la figura 51, se observa como la adición de CsA a las membranas celulares aisladas de CTP disminuye la fluidez de membrana. Al añadir después cilastatina no se revierte el efecto generado por la CsA (Fig. 51A). Sin embargo, al invertir el orden de adición, cilastatina impide la reducción de la fluidez causada por CsA (Fig. 51B).



**FIGURA 51. Medida de la fluidez de membrana en membranas aisladas de túbulo renales (tinción con DPH). (Tomada de Pérez M.)<sup>129</sup>. A. Efecto de la adición seriada de CsA (1µg/ml) seguido de cilastatina (200µg/ml) y Tritón-X-100, en la fluidez de membrana basal. B. Inhibición por cilastatina (200µg/ml) del efecto de CsA (1µg/ml) en la fluidez basal de membranas.**

Galán también observó disminución en la fluidez de membranas de ratas tratadas con CsA, que atribuyó a cambios en su composición lipídica <sup>58</sup>.

En la figura 52 puede observarse como cuando se usan dosis subletales de filipina y ciclodextrina (CDX) que alteran la integridad de las BDC, el transporte de CsA disminuye significativamente. Sin embargo el tratamiento con cilastatina también interfiere reduciendo dicho transporte. Al utilizar otro ligando de las BDC distinto a cilastatina, como la toxina B colérica, se puede observar como éste no tiene efecto significativo sobre el transporte de CsA al interior celular.



**FIGURA 52. Efecto de la integridad de membrana en el transporte de CsA al interior celular. (Tomada de Pérez M.)<sup>129</sup>. Cuantificación de la concentración intracelular de CsA en CTP tratadas simultáneamente durante 1 hora, con CsA (1 µg/ml) y cilastatina (200 µg/ml), filipina (10 µM), CDX (1 mM) y toxina B (10 µg/ml). Puede observarse como al tratar las células con drogas que reducen la integridad de las BDC el transporte de CsA es menor. La coincubación con cilastatina también interfiere con el transporte de CsA. Sin embargo la toxina B no tiene efecto sobre éste. ANOVA: p = 0.006. Análisis Post hoc: p < 0.05 vs. control.**

De este modo, teniendo en cuenta todo lo anterior, planteamos el siguiente mecanismo de acción de cilastatina. Cilastatina se une a la DHP-I que se encuentra anclada en las BDC del borde en cepillo de las CTP <sup>125</sup>, bloqueando la recircularización de las mismas y reduciendo la entrada al interior celular de los tóxicos disminuyendo por tanto, el daño renal generado por los fármacos tóxicos.

## 9.1.- RESUMEN

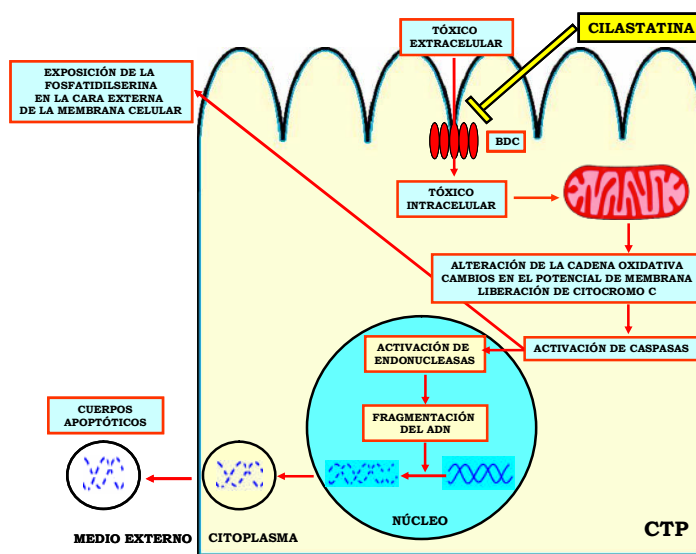
Se presenta a continuación a modo de resumen el esquema del efecto lesivo de los tóxicos estudiados y la nefroprotección ejercida por cilastatina. El tóxico se localiza en el medio externo, se transporta vía BDC y alcanza el medio interno. Una vez en el interior celular altera la cadena respiratoria, desencadena cambios en el potencial de membrana, y a consecuencia produce la liberación de citocromo C. Éste forma el apoptosoma junto a Apaf-1 y procaspasa-9, que se encargará de activar a caspasa-3.



Esta activación va a desencadenar varios efectos, como la externalización de la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana a la externa, activación de otras caspasa efectoras y de endonucleasas que fragmentan el ADN. Estos fragmentos se liberan al citosol, se rodean de membrana y forman los cuerpos apoptóticos. A continuación, tiene lugar el desprendimiento celular y por lo tanto la muerte por anoikis. Cuando se lleva a cabo el cotratamiento con los tóxicos estudiados y cilastatina, ésta es capaz de inhibir el transporte de los fármacos al interior celular vía BDC, disminuyendo su acumulación en las CTP, reduciendo con ello el daño producido por los tóxicos. De este modo, tiene lugar una disminución de los fenómenos tempranos y tardíos asociados con la apoptosis, así como la restauración de la morfología y de la capacidad regenerativa del epitelio tubular.

**FIGURA 53. Esquema resumen del efecto lesivo de los tóxicos estudiados y la nefroprotección ejercida por cilastatina en las CTP.**

Este esquema se cumple en el caso de la CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina y cisplatino pero no para el paracetamol, ya que la muerte ocasionada por este tóxico es mediada por caspasa-12.



Los resultados presentados en esta tesis indican que cilastatina muestra un efecto no conocido sobre las BDC del borde en cepillo del túbulo proximal, como consecuencia del cual es capaz de impedir en grados variables la nefrotoxicidad de antibióticos, citotóxicos, anestésicos e inmunosupresores. Dada las diferencias en estructura química, solubilidad en agua o lípidos y carácter iónico a pH fisiológico de los mismos, puede asumirse que el efecto nefroprotector de cilastatina puede extenderse a cualquier fármaco o compuesto capaz de lesionar el túbulo proximal. Esta nefroprotección de amplio espectro es específica para el riñón y no interfiere con los efectos de los tóxicos sobre sus propias dianas. Además, cilastatina está desprovista en sí misma de efectos tóxicos sobre las CTP. Por ello, su administración puede servir para reducir los efectos tóxicos a nivel renal de distintos fármacos, en diferentes situaciones médicas.

Cilastatina podría ser usada de forma generalizada como agente terapéutico para paliar la nefrotoxicidad producida por distintos fármacos de uso común en clínica, y así permitir que la dosis y el tiempo de tratamiento necesario de los mismos no se vieran comprometidos por el daño renal generado por estos tóxicos.

## **VIII.- CONCLUSIONES**

---

- 1.- Cilastatina no causa ningún efecto significativo sobre la dinámica de crecimiento, la confluencia celular, la morfología de la monocapa, la inducción de anoikis, la aparición de nucleosomas, o la función oxidativa mitocondrial en modelos experimentales *in vitro* sobre células tubulares proximales porcinas en cultivo e *in vivo* en un modelo animal en rata de fracaso renal agudo generado por cisplatino.
- 2.- El tratamiento conjunto de CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina, cisplatino y paracetamol con cilastatina en modelos experimentales *in vitro* de células del túbulo proximal, impidió la aparición del daño renal generado por los fármacos, reduciendo la muerte celular por apoptosis, la lesión mitocondrial y la alteración de la viabilidad celular.
- 3.- La acumulación de los tóxicos en el interior celular se encuentra reducida en el caso de CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina y paracetamol en presencia de cilastatina.
- 4.- Cilastatina lleva a cabo su acción nefroprotectora mediante la inhibición de un sistema de transporte utilizado por los fármacos para alcanzar el interior celular, mediante las balsas de colesterol.
- 5.- Cilastatina ejerce su acción como nefroprotector de manera órgano-específica sin influir en la acción terapéutica del fármaco tóxico en sus células diana.
- 6.- En el modelo animal, cilastatina protege del daño renal hemodinámico e histológico producido por el tratamiento con cisplatino.
- 7.- Cilastatina podría ser usada como agente terapéutico para paliar la nefrotoxicidad producida por distintos fármacos de uso común en clínica, y así permitir que la dosis y el tiempo de tratamiento necesario de los mismos no se vieran comprometidos por el daño renal generado por estos tóxicos.

## **IX.- BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Adachi, H. *et al.* Primary structure of human microsomal dipeptidase deduced from molecular cloning. *J. Biol. Chem.* **265**, 3992-3995 (1990).
2. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
3. Alberto Ortiz, A. T. C. C. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. James A. Dykens, Y. W. (ed.), pp. 291-310 (2008).
4. Ali, B. H., Al Moundhri, M. S., Tag, E. M., Nemmar, A. & Tanira, M. O. The ameliorative effect of cysteine prodrug L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **21**, 547-553 (2007).
5. Amore, A. *et al.* Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int.* **57**, 1549-1559 (2000).
6. Anglicheau, D. *et al.* Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int.* **70**, 1019-1025 (2006).
7. Arany, I. & Safirstein, R. L. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* **23**, 460-464 (2003).
8. Atessahin, A. *et al.* Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod. Toxicol.* **21**, 42-47 (2006).
9. Bagahie A, B. M. A. C. The effect of imipenem/cilastatin on acute cyclosporin nephrotoxicity in heart/lung transplant patients. *Crit Care Med* **23**, A241. 1995.  
Ref Type: Abstract
10. Baliga, R., Ueda, N., Walker, P. D. & Shah, S. V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* **29**, 465-477 (1997).
11. Barros, L. F., Hermosilla, T. & Castro, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* **130**, 401-409 (2001).
12. Bernardi, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* **79**, 1127-1155 (1999).
13. Bertrand, F. *et al.* A role for nuclear factor kappaB in the antiapoptotic function of insulin. *J. Biol. Chem.* **273**, 2931-2938 (1998).
14. Beyer, J. *et al.* Nephrotoxicity after high-dose carboplatin, etoposide and ifosfamide in germ-cell tumors: incidence and implications for hematologic recovery and clinical outcome. *Bone Marrow Transplant.* **20**, 813-819 (1997).
15. Birnbaum, J., Kahan, F. M., Kropp, H. & MacDonald, J. S. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am. J. Med.* **78**, 3-21 (1985).
16. Blakely, P. & McDonald, B. R. Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature. *J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 48-53 (1995).

17. Blanco-Colio, L. M., Tunon, J., Martin-Ventura, J. L. & Egido, J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int.* **63**, 12-23 (2003).
18. Bonventre, J. V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **43**, 1160-1178 (1993).
19. Boya, P., Cohen, I., Zamzami, N., Vieira, H. L. & Kroemer, G. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death. Differ.* **9**, 465-467 (2002).
20. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
21. Brown, D. Structure and function of membrane rafts. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 433-437 (2002).
22. Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L. & Eigenbrodt, E. H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab Med.* **117**, 1208-1214 (1993).
23. Calne, R. Y. *et al.* Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* **2**, 1323-1327 (1978).
24. Camano, P. S. *et al.* [Study on the role of the tubule in renal vasoconstriction induced by cyclosporine]. *Actas Urol. Esp.* **32**, 128-139 (2008).
25. Camargo, S. M., Francescato, H. D., Lavrador, M. A. & Bianchi, M. L. Oral administration of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubules of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **83**, 251-262 (2001).
26. Campbell, B. J., Lin, Y. C., Davis, R. V. & Ballew, E. The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 371-386 (1966).
27. Carmellini, M., Frosini, F., Filipponi, F., Boggi, U. & Mosca, F. Effect of cilastatin on cyclosporine-induced acute nephrotoxicity in kidney transplant recipients. *Transplantation* **64**, 164-166 (1997).
28. Castaneda, M. P. *et al.* Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* **76**, 50-54 (2003).
29. Chandrasekar, P. H. & Cronin, S. M. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients receiving aminoglycoside plus cyclosporine or aminoglycoside alone. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 845-849 (1991).
30. Chirino, Y. I. *et al.* Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol. Lett.* **176**, 48-57 (2008).
31. Ciccarelli, R. B., Solomon, M. J., Varshavsky, A. & Lippard, S. J. In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication. *Biochemistry* **24**, 7533-7540 (1985).
32. Clissold, S. P., Todd, P. A. & Campoli-Richards, D. M. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **33**, 183-241 (1987).

33. Cogan, U., Shinitzky, M., Weber, G. & Nishida, T. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescent probes. *Biochemistry* **12**, 521-528 (1973).
34. Cohen, G. M., Sun, X. M., Snowden, R. T., Dinsdale, D. & Skilleter, D. N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* **286** ( Pt 2), 331-334 (1992).
35. Cohen, S. M. & Lippard, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **67**, 93-130 (2001).
36. Collins, N. L. *et al.* G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5282-5291 (2005).
37. De Broe, M. E. *et al.* Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. *Kidney Int.* **25**, 643-652 (1984).
38. de Mattos, A. M., Olyaei, A. J. & Bennett, W. M. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am. J. Kidney Dis.* **35**, 333-346 (2000).
39. Deudero, J. J. *et al.* Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **283**, 11435-11444 (2008).
40. Do Amaral, C. L. *et al.* Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol.* **82**, 363-370 (2008).
41. Dobyan, D. C., Levi, J., Jacobs, C., Kosek, J. & Weiner, M. W. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **213**, 551-556 (1980).
42. Dos Santos, O. F., Boim, M. A., Barros, E. J. & Schor, N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* **40**, 742-747 (1991).
43. Drusano, G. L. & Standiford, H. C. Pharmacokinetic profile of imipenem/cilastatin in normal volunteers. *Am. J. Med.* **78**, 47-53 (1985).
44. Drusano, G. L. *et al.* Safety and tolerability of multiple doses of imipenem/cilastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **37**, 539-543 (1985).
45. Duke, R. C., Cohen, J. J. & Chervenak, R. Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* **137**, 1442-1447 (1986).
46. EIGER, I. Z. & GREENSTEIN, J. P. Addition products of dehydropeptides. *Arch. Biochem.* **19**, 467-473 (1948).
47. Enomoto, A. *et al.* Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 1711-1720 (2002).
48. Esteban-Fernandez, D., Verdaguer, J. M., Ramirez-Camacho, R., Palacios, M. A. & Gomez-Gomez, M. M. Accumulation, fractionation, and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin administration. *J. Anal. Toxicol.* **32**, 140-146 (2008).

49. Fadok, V. A. *et al.* Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J. Immunol.* **151**, 4274-4285 (1993).
50. Fadok, V. A. *et al.* Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.* **149**, 4029-4035 (1992).
51. Fatima, S., Yusufi, A. N. & Mahmood, R. Effect of cisplatin on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. *Hum. Exp. Toxicol.* **23**, 547-554 (2004).
52. Ferguson, M. A., Masterson, W. J., Homans, S. W. & McConville, M. J. Evolutionary aspects of GPI metabolism in kinetoplastid parasites. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**, 991-1005 (1991).
53. Ferri, K. F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**, E255-E263 (2001).
54. Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. & Vandenabeele, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **18**, 7719-7730 (1999).
55. Ford, D. M., Dahl, R. H., Lamp, C. A. & Molitoris, B. A. Apically and basolaterally internalized aminoglycosides colocalize in LLC-PK1 lysosomes and alter cell function. *Am. J. Physiol* **266**, C52-C57 (1994).
56. Francescato, H. D., Costa, R. S., Scavone, C. & Coimbra, T. M. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology* **230**, 64-75 (2007).
57. Fumarola, C. & Guidotti, G. G. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*. **9**, 77-82 (2004).
58. Galan, A. I., Munoz, M. E. & Jimenez, R. S-Adenosylmethionine protects against cyclosporin A-induced alterations in rat liver plasma membrane fluidity and functions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 774-781 (1999).
59. Galletti, P. *et al.* Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**, 1551-1558 (2005).
60. Girton, R. A., Sundin, D. P. & Rosenberg, M. E. Clusterin protects renal tubular epithelial cells from gentamicin-mediated cytotoxicity. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **282**, F703-F709 (2002).
61. Goetz, M. B. & Sayers, J. Nephrotoxicity of vancomycin and aminoglycoside therapy separately and in combination. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 325-334 (1993).
62. Golper, T. A. *et al.* Vancomycin pharmacokinetics, renal handling, and nonrenal clearances in normal human subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **43**, 565-570 (1988).
63. Gomez Campdera, F. J., Gonzalez, P., Carrillo, A., Estelles, M. C. & Rengel, M. Cisplatin nephrotoxicity: symptomatic hypomagnesemia and renal failure. *Int. J. Pediatr. Nephrol.* **7**, 151-152 (1986).



64. Gonzales-Vitale, J. C., Hayes, D. M., Cvitkovic, E. & Sternberg, S. S. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer* **39**, 1362-1371 (1977).
65. Greggi Antunes, L. M., Darin, J. D. & Bianchi, M. D. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol. Res.* **41**, 405-411 (2000).
66. Gruss, E. *et al.* Nephroprotective effect of cilastatin in allogeneic bone marrow transplantation. Results from a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant.* **18**, 761-765 (1996).
67. Gyure, W. L. Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin. Chem.* **23**, 876-879 (1977).
68. Hacki, J. *et al.* Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* **19**, 2286-2295 (2000).
69. Hammer, C., Thies, J. C., Mraz, W. & Mihatsch, M. Reduction of cyclosporin (CSA) nephrotoxicity by imipenem/cilastatin after kidney transplantation in rats. *Transplant. Proc.* **21**, 931 (1989).
70. Heywood, S. P. & Hooper, N. M. Inhibition of two gluconeogenic enzymes by glycosylphosphatidylinositol: a model for insulin action. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 10S (1994).
71. Hock, R. & Anderson, R. J. Prevention of drug-induced nephrotoxicity in the intensive care unit. *J. Crit Care* **10**, 33-43 (1995).
72. Hooper, N. M. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin. Chim. Acta* **266**, 3-12 (1997).
73. Hortelano, S., Castilla, M., Torres, A. M., Tejedor, A. & Bosca, L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 2315-2323 (2000).
74. Humes, H. D. & Weinberg, J. M. Alterations of renal tubular cell metabolism in acute renal failure. *Miner. Electrolyte Metab* **9**, 290-305 (1983).
75. Humes, H. D., Weinberg, J. M. & Knauss, T. C. Clinical and pathophysiologic aspects of aminoglycoside nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* **2**, 5-29 (1982).
76. Inselmann, G. *et al.* Modification of cisplatin-induced renal p-aminohippurate uptake alteration and lipid peroxidation by thiols, Ginkgo biloba extract, deferoxamine and torbafylline. *Nephron* **70**, 425-429 (1995).
77. Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* **99**, 2467-2498 (1999).
78. Jones, A. F., Harvey, J. M. & Vale, J. A. Hypophosphataemia and phosphaturia in paracetamol poisoning. *Lancet* **2**, 608-609 (1989).
79. Kahan, F. M. & Rogers, J. D. Imipenem/cilastatin: evolution of the sustained-release intramuscular formulation. *Chemotherapy* **37 Suppl 2**, 21-25 (1991).
80. Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* **478**, 23-43 (2001).

81. Kawabata, T., Ma, Y., Yamador, I. & Okada, S. Iron-induced apoptosis in mouse renal proximal tubules after an injection of a renal carcinogen, iron-nitritotriacetate. *Carcinogenesis* **18**, 1389-1394 (1997).
82. Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J. Cell Biol.* **143**, 1353-1360 (1998).
83. Kerr, J. F. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**, 13-20 (1971).
84. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
85. Kishore, B. K., Krane, C. M., Di, I. D., Menon, A. G. & Cacini, W. Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria. *Kidney Int.* **58**, 701-711 (2000).
86. Klintmalm, G. B., Iwatsuki, S. & Starzl, T. E. Nephrotoxicity of cyclosporin A in liver and kidney transplant patients. *Lancet* **1**, 470-471 (1981).
87. Koopman, G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415-1420 (1994).
88. Kozak, E. M. & Tate, S. S. Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J. Biol. Chem.* **257**, 6322-6327 (1982).
89. Kropp, H., Sundelof, J. G., Hajdu, R. & Kahan, F. M. Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 62-70 (1982).
90. Kruidering, M. *et al.* Evaluation of nephrotoxicity in vitro using a suspension of highly purified porcine proximal tubular cells and characterization of the cells in primary culture. *Exp. Nephrol.* **2**, 324-344 (1994).
91. Kruidering, M., Van de, W. B., de, H. E., Mulder, G. J. & Nagelkerke, J. F. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 638-649 (1997).
92. Kuhad, A., Pilkhwai, S., Sharma, S., Tirkey, N. & Chopra, K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10150-10155 (2007).
93. Kuhlmann, M. K., Burkhardt, G. & Kohler, H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**, 2478-2480 (1997).
94. Kusama, M. *et al.* Effect of cilastatin on renal handling of vancomycin in rats. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1173-1176 (1998).
95. Lea, J. P., Sands, J. M., McMahon, S. J. & Tumlin, J. A. Evidence that the inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by FK506 involves calcineurin. *Kidney Int.* **46**, 647-652 (1994).

96. Lennon, S. V., Martin, S. J. & Cotter, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* **24**, 203-214 (1991).
97. Levine, J. S., Koh, J. S., Triaca, V. & Lieberthal, W. Lysophosphatidic acid: a novel growth and survival factor for renal proximal tubular cells. *Am. J. Physiol* **273**, F575-F585 (1997).
98. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).
99. Li-Weber, M., Palfi, K., Giaisi, M. & Krammer, P. H. Dual role of the anti-inflammatory sesquiterpene lactone: regulation of life and death by parthenolide. *Cell Death. Differ.* **12**, 408-409 (2005).
100. Lieberthal, W., Menza, S. A. & Levine, J. S. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol* **274**, F315-F327 (1998).
101. Lorz, C. *et al.* Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 380-389 (2004).
102. Luke, D. R., Vadiiei, K. & Lopez-Berestein, G. Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* **7**, 1-7 (1992).
103. Luschen, S., Ussat, S., Kronke, M. & dam-Klages, S. Cleavage of human cytosolic phospholipase A2 by caspase-1 (ICE) and caspase-8 (FLICE). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 92-98 (1998).
104. Madias, N. E. & Harrington, J. T. Platinum nephrotoxicity. *Am. J. Med.* **65**, 307-314 (1978).
105. Markewitz, A. *et al.* Reduction of cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation* **57**, 865-870 (1994).
106. Martin, L. J. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int. J. Mol. Med.* **7**, 455-478 (2001).
107. Mathew, T. H. Drug-induced renal disease. *Med. J. Aust.* **156**, 724-728 (1992).
108. Mattson, M. P. *et al.* Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* **23**, 222-229 (2000).
109. Meldrum, K. K. *et al.* Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappaB dependent mechanism. *J. Urol.* **168**, 248-252 (2002).
110. Millan, J. *et al.* Isolation of lipid raft-associated proteolipids. *Methods Mol. Biol.* **228**, 223-230 (2003).
111. Mohan, I. K. *et al.* Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **58**, 802-808 (2006).
112. Mora, L. O., Antunes, L. M., Francescato, H. D. & Bianchi, M. L. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* **47**, 517-522 (2003).

113. Morandat, S., Bortolato, M. & Roux, B. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, 473-478 (2002).
114. Mraz, W., Modic, P. K. & Hammer, C. Impact of imipenem/cilastatin on cyclosporine metabolism and excretion. *Transplant. Proc.* **24**, 1704-1708 (1992).
115. Mraz, W., Sido, B., Knedel, M. & Hammer, C. Concomitant immunosuppressive and antibiotic therapy--reduction of cyclosporine A blood levels due to treatment with imipenem/cilastatin. *Transplant. Proc.* **19**, 4017-4020 (1987).
116. Nakagawa, T. *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103 (2000).
117. Nakamura, T., Kokuryo, T., Hashimoto, Y. & Inui, K. I. Effects of fosfomycin and imipenem-cilastatin on the nephrotoxicity of vancomycin and cisplatin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 227-232 (1999).
118. Naziroglu, M., Karaoglu, A. & Aksoy, A. O. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* **195**, 221-230 (2004).
119. Nitanaï, Y., Satow, Y., Adachi, H. & Tsujimoto, M. Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **321**, 177-184 (2002).
120. Norrby, S. R. *et al.* Urinary recovery of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 300-307 (1983).
121. Nosjean, O., Briolay, A. & Roux, B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1331**, 153-186 (1997).
122. Olsen, T. S., Olsen, H. S. & Hansen, H. E. Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **406**, 75-89 (1985).
123. Padanilam, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284**, F608-F627 (2003).
124. Park, M. S., De, L. M. & Devarajan, P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 858-865 (2002).
125. Parkin, E. T., Turner, A. J. & Hooper, N. M. Differential effects of glycosphingolipids on the detergent-insolubility of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase. *Biochem. J.* **358**, 209-216 (2001).
126. Paschen, W. & Frandsen, A. Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J. Neurochem.* **79**, 719-725 (2001).
127. Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Brandes, A. A., Rossi, E. & Monfardini, S. The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **60**, 59-75 (2006).

128. Perez de, H. J., de, A. G., Calvino, M., Benito, S. & Parra, T. [Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells]. *Nefrologia*. **27**, 565-573 (2007).
129. Perez, M. *et al.* Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 2445-2455 (2004).
130. Perneger, T. V., Whelton, P. K. & Klag, M. J. Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophen, aspirin, and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1675-1679 (1994).
131. Price, P. M., Safirstein, R. L. & Megyesi, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **286**, F378-F384 (2004).
132. Razani, B., Woodman, S. E. & Lisanti, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* **54**, 431-467 (2002).
133. Rodriguez-Barbero, A., Bosque, E., Rivas-Cabaero, L., Arevalo, M. & Lopez-Novoa, J. M. Effect of platelet activating factor antagonist treatment on gentamicin nephrotoxicity. *Mediators. Inflamm.* **1**, 23-26 (1992).
134. Rodriguez-Puyol, D. *et al.* Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* **35**, 632-637 (1989).
135. Rybak, M. J., Albrecht, L. M., Berman, J. R., Warbasse, L. H. & Svensson, C. K. Vancomycin pharmacokinetics in burn patients and intravenous drug abusers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 792-795 (1990).
136. Saad, S. Y., Arafah, M. M. & Najjar, T. A. Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 455-460 (2007).
137. Sachs, D. H. *et al.* Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* **22**, 559-567 (1976).
138. Sack, K., Herhahn, J., Marre, R. & Schulz, E. Renal tolerance of imipenem/cilastatin and other beta-lactam antibiotics in rats. *Infection* **13 Suppl 1**, S156-S160 (1985).
139. Safirstein, R. Renal stress response and acute renal failure. *Adv. Ren Replace. Ther.* **4**, 38-42 (1997).
140. Saikumar, P. & Venkatachalam, M. A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin. Nephrol.* **23**, 511-521 (2003).
141. Salahudeen, A. K., Huang, H., Joshi, M., Moore, N. A. & Jenkins, J. K. Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am. J. Transplant.* **3**, 273-280 (2003).
142. Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D. P. & Orrenius, S. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *FEBS Lett.* **431**, 167-169 (1998).
143. Savill, J. Apoptosis and renal injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4**, 263-269 (1995).

144. Savill, J. S., Henson, P. M. & Haslett, C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J. Clin. Invest* **84**, 1518-1527 (1989).
145. Schor, N., Ichikawa, I., Rennke, H. G., Troy, J. L. & Brenner, B. M. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int.* **19**, 288-296 (1981).
146. Schwartz, D. *et al.* Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am. J. Physiol* **267**, F374-F379 (1994).
147. Shimizu, A. & Yamanaka, N. Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **64**, 171-180 (1993).
148. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487 (1999).
149. Siddik, Z. H. Biochemical and molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Cancer Treat. Res.* **112**, 263-284 (2002).
150. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279 (2003).
151. Sido, B., Hammer, C., Mraz, W. & Krombach, F. Nephroprotective effect of imipenem/cilastatin in reducing cyclosporine toxicity. *Transplant. Proc.* **19**, 1755-1758 (1987).
152. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39 (2000).
153. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449 (1995).
154. Sueishi, K. *et al.* Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **451**, 203-208 (2002).
155. Sung, M. J. *et al.* Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int.* (2008).
156. Takeda, A. & Takeda, N. Stress signal to survival and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **874**, 427-435 (1999).
157. Takeda, J. & Kinoshita, T. GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 367-371 (1995).
158. Takeda, M. *et al.* Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **419**, 113-120 (2001).
159. Tejedor, A. *et al.* Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr. Med. Res. Opin.* **23**, 505-513 (2007).
160. Thomenius, M. J. & Distelhorst, C. W. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *J. Cell Sci.* **116**, 4493-4499 (2003).

161. Tomei, L. D., Shapiro, J. P. & Cope, F. O. Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 853-857 (1993).
162. Toyoguchi, T. & Nakagawa, Y. [Nephrotoxicity and drug interaction of vancomycin (2)]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **107**, 225-235 (1996).
163. Toyoguchi, T., Takahashi, S., Hosoya, J., Nakagawa, Y. & Watanabe, H. Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1985-1990 (1997).
164. Tumlin, J. A. & Sands, J. M. Nephron segment-specific inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by cyclosporin A. *Kidney Int.* **43**, 246-251 (1993).
165. varez-Arroyo, M. V. *et al.* Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. *Circ. Res.* **91**, 202-209 (2002).
166. Walker, P. R., Kokileva, L., LeBlanc, J. & Sikorska, M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* **15**, 1032-1040 (1993).
167. Wang, D. & Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307-320 (2005).
168. Wang, J., Biju, M. P., Wang, M. H., Haase, V. H. & Dong, Z. Cytoprotective effects of hypoxia against cisplatin-induced tubular cell apoptosis: involvement of mitochondrial inhibition and p53 suppression. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1875-1885 (2006).
169. Webster, A. C., Woodroffe, R. C., Taylor, R. S., Chapman, J. R. & Craig, J. C. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* **331**, 810 (2005).
170. Welch, C. L. & Campbell, B. J. Uptake of glycine from L-alanylglycine into renal brush border vesicles. *J. Membr. Biol.* **54**, 39-50 (1980).
171. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306 (1980).
172. YAMADA, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 445-458 (1955).
173. Yanagida, C., Ito, K., Komiya, I. & Horie, T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chem. Biol. Interact.* **148**, 139-147 (2004).
174. Zajchowski, L. D. & Robbins, S. M. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* **269**, 737-752 (2002).
175. Zamble, D. B. & Lippard, S. J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 435-439 (1995).
176. Zugasti, O. *et al.* Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6706-6717 (2001).

## **X.- ANEXO**

---



Todos los resultados presentados en esta tesis han sido incluidos en una solicitud de Patente Internacional con fecha 11 de Julio de 2008 y n° PCT/ES2008/070137, “Uso de la cilastatina para reducir la nefrotoxicidad de distintos compuestos”, solicitada y/o inventada por: Tejedor Jorge, Alberto; Lázaro Fernández, Alberto; **Camaño Páez, Sonia**; Torres Redondo, Ana María; Lázaro Manero, Jose Antonio; Castilla Barba, Manuela; De Lucas Collantes, María del Carmen.

**Los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados parcialmente en:**

El hecho de haber preparado y solicitado una patente con los resultados obtenidos en la tesis, ha propiciado el hecho de no haber podido publicar ninguno de ellos. Actualmente se han enviado a publicar los siguientes artículos científicos:

📖 **Camano S**, Lazaro A, Torres A, de Lucas C, Moreno E, Gomez-Gomez M, Tejedor A. “Cilastatin ameliorates cisplatin cytotoxicity in renal tubular cells”. Enviado a *Eur. J. Cancer*, 2008.

📖 **Camano S**, Lázaro A, Torres A, de Lucas C, Cercenado E, Humanes B, Tejedor A. “Protective effects of cilastatin on gentamicin and vancomycin induced renal injury”. Enviado a *Nephrol Dial Transplant*, 2008.

**Otros artículos publicados durante el desarrollo de la Tesis:**

📖 **Camaño Páez S**, Lázaro Fernández A, Callejas Martínez R, Lázaro Manero JA, Castilla Barba M, Martín-Vasallo P, Martínez Escandell A, Tejedor Jorge A. “Papel del túbulo en la vasoconstricción renal inducida por ciclosporina”. *Actas Urol.* 2008; 32: 128-139.

📖 Luis Puente-Maestu, José Pérez-Parra, Raul Godoy, Nicolás Moreno, Alberto Tejedor, Federico González-Aragoneses, José-Luis Bravo, Felipe Villar, **Sonia Camano**, Alvar Agusti. “Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of copd patients”. *European Respiratory Journal*, 2008 (En prensa).

**Los resultados de esta Tesis han sido presentados parcialmente en los siguientes congresos:**

- ✎ *The American Society of Nephrology 38th annual renal week meeting.* Filadelfia (Estados Unidos). Noviembre 2005. "Cell death induced by cyclosporin A, tacrolimus, cisplatin, vancomycin and gentamycin on proximal tubules is reduced by cilastatin treatment". Ana M Torres, Carmen de Lucas, **Sonia Camaño**, María Pérez y Alberto Tejedor. (PÓSTER). Publicación: *J Am Soc Nephrol*, 2005, vol 16: SA-PO297.
- ✎ *XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología.* Cádiz (España). 30 Septiembre- 2 Octubre 2007. "Efectos de cilastatina sobre la apoptosis inducida por nefrotóxicos". C. de Lucas, **S. Camano**, A. Lazaro, A. Torres, R. Callejas, A. Tejedor. (CHARLA ORAL). Publicación: *Nefrología*, 2007, vol 27 (4): 26.

**Otras presentaciones a congresos durante el desarrollo de la Tesis:**

- ✎ *The American Society of Nephrology 38th annual renal week meeting.* Filadelfia (Estados Unidos). Noviembre 2005. "In proximal tubule, reversible mitochondrial swelling determines calcium buffer capacity and modifies cell answer to cyclosporin and tacrolimus". Ana M Torres, Manuela Castilla, Carmen de Lucas, **Sonia Camaño**, Eduardo Junco y Alberto Tejedor. Póster. (PÓSTER). Publicación: *J Am Soc Nephrol*, 2005, vol 16: PTH-P0600.
- ✎ *XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología.* San Sebastian (España). 4 al 8 de Octubre 2008. "La vasoconstricción renal observada con el uso de CsA no es causa sino consecuencia de la lesión tubular proximal. Evidencias de un modelo porcino de toxicidad aguda por CsA". **S. Camaño**, JA. Lázaro, A. Lázaro, P. Martín-Vasallo, B. Humanes, F. Liaño, J. Luño y A. Tejedor. (CHARLA ORAL). Publicación: *Nefrología*, 2008, vol 28 (4): 123.